

Marisa Jádna Silva Frederico

**ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO DAS
SULFONAMIDAS E ACILHIDRAZONAS SINTÉTICAS NA
HOMEOSTASIA DA GLICOSE**

Tese apresentada a Banca Examinadora do
Programa de Pós Graduação em Bioquímica
do Centro de Ciências Biológicas da Univer-
sidade Federal de Santa Catarina, como re-
quisito para a obtenção de título de Doutor
em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Mena
Barreto Silva

Florianópolis, SC – Brasil,
2014

Frederico, Marisa Jádna

Estudo do efeito e do mecanismo de ação das sulfonamidas e acilhidrazonas sintéticas na homeostasia da glicose / Marisa Jádna Frederico ; orientadora, Fátima Regina Mena Barreto Silva - Florianópolis, SC, 2014.
184 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. derivados de sulfonamidas baseados em um fragmento da glibenclamida. 3. acilhidrazonas sintéticas. 4. relação estrutura atividade. 5. efeito terapêutico para o tratamento do Diabetes . I. Mena Barreto Silva, Fátima Regina . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Marisa Jádna Silva Frederico

ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO DAS SULFONAMIDAS E ACILHIDRAZONAS SINTÉTICAS NA HOMEOSTASIA DA GLICOSE

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do Título de Doutor em Bioquímica e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Bóris Juan Carlos Stambuk

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:

Dra. Adriane Belló Klein (Fisiologia/UFRGS)

Dra. Patrícia Fernanda Schuck (Ciências da Saúde UNESC)

Dr. Flávio Henrique Reginato (Ciências Farmacêuticas/CCS/UFSC)

Dra. Carla Inês Tasca (BQA/CCB/UFSC)

Dra. Iara Kretzer (PPGFAR/CCS/UFSC)

Florianópolis, março de 2014.

“Se vi mais longe, foi porque estava nos ombros de gigantes”.

Issac Newton

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela confiança, excelente orientação, dedicação, amizade, oportunidade além de ter sido a primeira orientadora que acreditou no meu potencial;

Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, pela amizade, pelo auxílio e sugestões, por ter sempre me atendido prontamente quando precisei de ajuda;

Aos prof. Dr. Ricardo Nunes e Rosendo Yunes e a Dra. Arianne Zamoner, pela colaboração, auxílio, atenção e amizade;

Aos colegas do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, da Profa. Fátima, do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular, da Profa. Arianne, do Laboratório do departamento de Química- LABIEX- do prof. Ricardo e do Laboratório da Neurobiologia da Dor - LANDI - do prof Adair, pela amizade, pela convivência, pela ajuda, pelas discussões e trocas de experiências que contribuíram para este trabalho;

Aos Professores componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, que contribuíram para minha formação;

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica;

À CAPES pelo auxílio financeiro;

Ao meu amor, Gilberto Souza da Silva e a minha família por torcerem pelo meu sucesso e por me amarem e apoiarem sempre incondicionalmente, o que tornou possível a realização deste meu objetivo.

A todos os meus amigos e familiares que aqui não foram mencionados, pela torcida e pelo apoio em todas as horas, que também contribuíram para a realização deste sonho;

A Deus pela força inexplicável.

RESUMO

Durante as últimas décadas, observou-se um aumento surpreendente na prevalência do diabetes melito (DM) em populações de várias regiões do mundo, inclusive no Brasil. Os tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente não impedem a progressão da doença, apenas amenizam os sintomas. Neste cenário, a pesquisa de novas moléculas com potencial terapêutico para o tratamento do diabetes são de extrema importância. Modificações na estrutura química fundamental da glibenclamida, uma sulfonilureia de segunda geração, pode aumentar o efeito biológico e ser mais efetiva no controle da glicemia. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito antidiabético de 12 derivados da sulfonamida sintetizados com base em um fragmento de glibenclamida. Os efeitos destes derivados foram investigados sobre a glicemia, a secreção de insulina, a captação de cálcio, o conteúdo de glicogênio, e as atividades das dissacaridases intestinais e da lactato desidrogenase. A sulfonamida **5**, substituída com o grupo 4-OCH₃-fenilo, apresentou a melhor redução da glicemia na curva de tolerância oral à glicose e a melhor secreção de insulina entre os 12 compostos estudados. Os derivados da sulfonamida **3**, **5**, **7** e **9** estimularam o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas da mesma maneira que as sulfonilureias. O efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação de cálcio foi mediado pelos canais de K⁺-ATP, canais de cálcio do tipo L dependentes da voltagem, cálcio intracelular e pela proteína cinase C em células beta nas ilhotas pancreáticas. No intestino, a sulfonamida **5** inibiu a atividade da maltase e da sacarase e, no músculo esquelético, aumentou o conteúdo de glicogênio. A toxicidade de sulfonamida **5** não foi detectada pelo ensaio da LDH. Ainda, nesta primeira parte do trabalho, a sulfonamida **11**, teve uma notável ação antihiperglicêmica, por isso, foi avaliado a capacidade deste composto em aumentar a captação da glicose em tecidos periféricos e diminuir produtos finais de glicação avançada (AGEs). A sulfonamida **11**, substituída com o grupo tiofenil aumentou a captação de glicose em tecido adiposo e muscular. O efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose envolve a ativação de canais K⁺-ATP e, a ativação da translocação e da fusão de vesículas contendo GLUT4 na membrana plasmática do adipócito. A sulfonamida **11** reduziu a formação de AGEs, nas doses de 0,1 e 1 µg/ml em 7, 14 e 28 dias de incubação. A partir destes resultados obtidos concluímos que as sulfonamidas sintetizadas podem ser uma boa opção terapêutica para o tratamento do diabetes. As acilhidrazonas são compostos sintéticos promissores que apresentam um amplo

espectro terapêutico e, recentemente, foram patenteadas por notável atividade antileucêmica. Na segunda parte deste trabalho objetivo do estudo foi investigar o efeito anti-diabético das acilhidrazonas **1**, **2**, **3** e **4**. As acilhidrazonas foram investigadas sobre a glicemia, a secreção de insulina, a captação de cálcio, o conteúdo de glicogênio, a captação de glicose e a atividade da lactato desidrogenase. As acilhidrazonas **1** e **4** foram capazes reduzir a glicemia na curva de tolerância à glicose. Um efeito secretagogo notável *in vivo* foi mostrado pela acilhidrazona **1** ou ácido [(2E)-N-(1'-naftil) -3,4,5-trimetoxibenzohidrazida] e, em experimentos *in vitro*, um efeito agudo e dependente da dose, na captação de cálcio em ilhotas pancreáticas, foi observado. Este efeito estimulatório na captação de cálcio, parece ser mediado, pelo menos em parte, pelos canais K^+ -ATP. O efeito insulinomimético foi evidenciado pela glicemia de ratos diabéticos induzidos por aloxano. A acilhidrazona **1** induziu um aumento significativo no conteúdo de glicogênio *in vivo* e na captação de glicose no músculo esquelético *in vitro*. A partir destes dados, foi analisado o mecanismo de ação da acilhidrazona **1** (BZD) na captação de glicose em músculo esquelético e o efeito *in vivo* na atividade das dissacaridases intestinais. O efeito agudo do BZD na captação de glicose foi mediado pelo aumento da quantidade e da translocação de GLUT4 na membrana plasmática do músculo esquelético. O efeito genômico, bem como a translocação do GLUT4 envolveu a ativação de PI 3-K e da MAPK. Ainda, a integridade microtúbulos para o processo de adesão e do ancoramento das vesículas contendo GLUT4 foi crucial para o efeito estimulatório do BZD na captação da glicose. Além disso, o BZD reduziu a atividade das dissacaridases intestinais, um efeito adicional na homeostasia da glicose que reforçou o potencial terapêutico para o tratamento do diabetes.

Palavras-chave: sulfonamidas, acilhidrazonas, hiperglicemia, secreção de insulina, captação de cálcio, captação de glicose e diabetes melito.

ABSTRACT

During the last decades, there has been a surprising increase in the prevalence of diabetes mellitus (DM) in populations from various regions of the world, including Brazil. The currently available pharmacological treatments do not prevent the progression of the disease, only alleviate symptoms. In this scenario, the research for new molecules with therapeutic potential for the treatment of diabetes are of utmost importance. Fundamental changes in the core structure of glibenclamide, a sulfonylurea second generation, can increase the biological effect and be more effective to glycemia control. The objective of this study was to investigate the antidiabetic effect of 12 sulfonamide derivatives synthesized based on a glibenclamide fragment. The effects of these derivatives were investigated on blood glucose, insulin secretion, calcium uptake, glycogen content, and the activities of intestinal disaccharidase and lactate dehydrogenase. The sulfonamide **5**, replaced with 4-OCH₃-phenyl group, showed the best reduction in blood glucose in the oral glucose tolerance curve and better insulin secretion among the 12 compounds studied. The sulfonamide derivatives **3**, **5**, **7** and **9** stimulated calcium influx in pancreatic islets in the same manner as the sulfonylureas. The sulfonamide **5** stimulatory effect on calcium uptake was mediated by ATP-dependent K⁺ channels (K⁺-ATP), intracellular calcium and by protein kinase C in beta cells of the pancreatic islets. In the intestine, the sulfonamide **5** inhibit the activity of sucrase and maltase and, skeletal muscle glycogen content increased. The sulfonamide **5** toxicity was not detected by LDH assay. Still, this first part of the work, the sulfonamide **11**, had a remarkable anti hyperglycemic action, so it was evaluated the ability of this compound to increase glucose uptake in peripheral tissues and decrease advanced glycation end products (AGEs). The sulfonamide **11**, substituted with thiophenyl group increased glucose uptake in adipose and muscle tissue. The sulfonamide **11** stimulatory effect on glucose uptake involves the activation of K⁺-ATP channels and activation, translocation and fusion of vesicles containing GLUT4 at the adipocytes on plasma membrane. The sulfonamide **11** reduced AGES formation at doses of 0.1 and 1 mg/mL at 7, 14 and 28 days of incubation. From these results we concluded that the synthesized sulfonamides can be a good therapeutic option for the treatment of diabetes. The acylhydrazones are promising synthetic compounds that exhibit a wide therapeutic spectrum and has recently been patented by remarkable antileukemic activity. In the second part of this

study objective was to investigate the anti-diabetic effect of acylhydrazones **1**, **2**, **3** and **4**. Acylhydrazones were investigated on blood glucose, insulin secretion, calcium uptake, glycogen content, glucose uptake and lactate dehydrogenase activity. The acylhydrazones **1** and **4** were able to reduce glycemia in glucose tolerance curve. A remarkable secretagogue effect *in vivo* was shown by acylhydrazone **1** [(2E)-N-(1'-naphthyl)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide], and *in vitro* experiments, an acute and dose-dependent effect on the calcium uptake in pancreatic islets was observed. This calcium uptake stimulatory effect seems to be mediated, at least in part by K^+ -ATP channels. The insulinomimetic effect was evidenced by glycemia in diabetic rats induced by alloxan. The acylhydrazone **1** induced a significant increase in glycogen content *in vivo* and glucose uptake in skeletal muscle *in vitro*. From these data, we investigated the acylhydrazone **1** (BZD) mechanism of action in glucose uptake in skeletal muscle and the effect on activity of intestinal disaccharidases *in vivo*. The acute effect of BZD on glucose uptake was mediated by the increased amount of GLUT4 translocation to the plasma membrane of skeletal muscle. Genomic effect as well as GLUT4 translocation involving the activation of PI 3-K and MAPK. Still, the microtubules to the accession process and the anchoring of vesicles containing GLUT4 integrity was crucial for the stimulatory effect of BZD in glucose uptake. Furthermore, the BZD reduced activity of intestinal disaccharidases, an additional effect on glucose homeostasis has reinforced therapeutic potential for the treatment of diabetes.

Keywords: sulfonamides, acylhydrazones, glycemia, insulin secretion, pancreatic islets, calcium uptake, glucose uptake, diabetes mellitus.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina (do inglês: adenosine diphosphate)
AGEs	Produtos finais de glicação avançada (do inglês: advanced glycation end-product)
Akt	Proteína cinase B (do inglês: protein kinase B)
AMP	Monofosfato de adenosina (do inglês: adenosine monophosphate)
AMPK	Proteína cinase ativada pelo 5'- AMP (do inglês: 5' AMP-activated protein kinase)
aPKC(ζ e λ)	Isoformas da PKC atípica (do inglês: atypical protein kinase C isoforms)
AS160	Proteína substrato da Akt de 160 kDa (do inglês: Akt substrate of 160 kDa)
ATP	Trifosfato de adenosina (do inglês: adenosine triphosphate)
BZD	Acilhidrazona 1 ou ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida
Cbl	Proteína ligase a ubiquitina E3 (do inglês: E3 ubiquitin-protein ligase)
CCVD	Canais de cálcio dependentes da voltagem (do inglês: voltage-dependent calcium channels)
CEUA	Comitê de ética do uso de animais
CoMFA	Análise conformacional Monte Carlo (do inglês: Comparative Molecular Field Analysis)
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAG	Diacilglicerol
DM1	Diabetes Mellito tipo 1
DM2	Diabetes Mellito tipo 2
DMSO	Dimetil sulfoxido
EM	Espectrometria de massa
FoxO	Fator de transcrição (do inglês: forkhead box protein transcription factors)
GAP	Proteína ativadora de GTPases (do inglês: GTPase-activating protein)
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose (do inglês: glucose-dependent insulintropic peptide)
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1 (do inglês: glucagon-

	like peptide-1)
GLUT2	Proteína transportadora de glicose 2 (do inglês: glucose transporter type 2)
GLUT4	Proteína transportadora de glicose 4 (do inglês: glucose transporter type 4)
GLUT5	Proteína transportadora de glicose 5 (do inglês: glucose transporter type 5)
Grb2	Proteína adaptadora ligada ao receptor de fator de crescimento (do inglês: growth factor receptor-bound protein 2)
GSK-3	Sintase de glicogênio 3 (do inglês: glycogen synthase kinase 3)
GSV	Vesículas contendo GLUT4 (do inglês: GLUT4 storage vesicles)
HbA1c	Hemoglobina glicada
II	Índice insulinogênico
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IR	Receptor de insulina (do inglês: insulin receptor)
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1 (do inglês: insulin receptor substrate 1)
IRS-2	Substrato do receptor de insulina 2 (do inglês: insulin receptor substrate 2)
IV	Espectros de infravermelho
K ⁺ -ATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP (do inglês: ATP-sensitive potassium channel)
Kd	Constante de dissociação
Kir6.x	Subunidade do canal K ⁺ -ATP formadora do poro (do inglês: inwardly-rectifying potassium channels)
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Cinase ativada por mitogénio seletiva para serina/treonina (do inglês: mitogen-activated protein kinases)
MEK	Proteína cinase da cinase ativada por mitogénio seletiva para serina/treonina (do inglês: mitogen-activated protein kinase kinase)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina (do inglês: phosphate buffered saline)
p38 MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno p 38
PKD1	Proteína cinase 1 dependente de fosfatidil-inositol (do inglês: phosphatidylinositol dependent kinase)

PEPCK	Proteína carboxicinase fosfoenolpiruvato (do inglês: phosphoenolpyruvate carboxykinase)
PI 3-K	Proteína cinase 3 fosfatidil-inositol (do inglês: phosphatidylinositol 3-kinase)
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinase A (do inglês: protein kinase A)
PKC	Proteína cinase C (do inglês: protein kinase C)
PLC	Fosfolipase C (do inglês:
PMA	Éster de forbol acetato 12 miristato 13 (do inglês: phorbol 12-myristate 13-acetate)
PP1	Proteína fosfatase 1 (do inglês: protein phosphatase)
RMN	Ressonância magnética nuclear de espectroscopia
RP 2254	P-amino-benzeno-sulfonamido-isopropiltiodiazol
RPP	Vesícula prontamente disponível para fusão (do inglês: readily releasable pool)
SH2	domínio 2 homólogo ao Src (do inglês: src homology 2)
SNAP23	Proteína de 23 kD associada à sinaptossoma (do inglês: synaptosomal-associated protein 23)
SNARE	Receptor de proteínas de fixação a proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida solúvel (do inglês: um acrônimo derivado do "SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor")
SUR	Receptor de sulfoniluréia (do inglês: sulfonylurea receptor)
TCA	Ácido tricloroacético (do inglês: trichloroacetic acid)
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês: thin layer chromatography)
TMs	Transmembrana
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
[U- ¹⁴ C]DG	Deoxiglicose
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa (do inglês: very-low-density lipoprotein)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Principais fatores que contribuem para a hiperglicemia no DM2. Fonte: Adaptado de DE FRONZO, 1999.....	30
Figura 1.2. Perda da função pancreática com o decorrer do tempo de diabetes. Fonte: Adaptado de HOLMANN, 1998.....	32
Figura 1.3. As duas fases da secreção fisiológica da insulina. Fonte: Adaptado de YANG e BERGGREN, 2006.....	32
Figura 1.4. Formação de AGES. Fonte: Adaptado de PEPPA, URIBARRI e VLASSARA, 2003.....	34
Figura 1.5. Mecanismo de secreção de insulina. Fonte: Adaptado de NELSON e COX, 2011.....	36
Figura 1.6. Vias de sinalização da insulina mediando a captação de glicose. Fonte: Adaptado de GRUSOVIN e MACAULAY, 2003.....	40
Figura 4.1. Envolvimento dos canais K^+ -ATP e dos CCDV do tipo L no efeito estimulatório da sulfonamida 5 na captação $^{45}Ca^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. (A), diazoxida (250 μ M) (B), nifedipina (1 μ M) estavam presentes nos último 15 min de pré-incubação e durante o período de incubação. Tempo de pré-incubação: 60 min, incubação: 10 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. $^c p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. $^{\#}$ Comparado com o grupo sulfonamida 5	69
Figura 4.2. Envolvimento do cálcio intracelular e via de sinalização da PKC no efeito estimulatório da sulfonamida 5 na captação $^{45}Ca^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. (A), BAPTA-AM (50 μ M) (B), RO-31820 (50 μ M) estavam presentes nos último 15 min de pré-incubação e durante o período de incubação. Tempo de pré-incubação: 60 min, incubação: 10 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. $^c p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. $^{\#}$ Comparado com o grupo sulfonamida 5	71

Figura 4.3. Modelo hipotético do mecanismo de ação da sulfonamida **5** em células beta. Envolvimento dos canais K^+ -ATP, dos canais de cálcio tipo L dependentes de voltagem, do cálcio intracelular e da via de sinalização da PKC no efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação $^{45}Ca^{2+}$. K^+ -ATP: canais de potássio sensíveis ao ATP, K^+ : íon potássio, Ca^{2+} : íon cálcio, PKC: proteína cinase C.....72

Figura 4.4. Efeito da sulfonamida **5** e da glibenclamida na atividade da maltase (A) e da sacarase (B), na porção do duodeno do intestino de rato. Tempo de incubação, 5 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 4$ para cada grupo. ^a $p \leq 0,05$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.....74

Figura 5.1. (A), Estrutura química da Sulfonamida **11**. (B) Efeito estimulatório da Sulfonamida **11** (1, 10 e 100 μM) na captação de glicose no tecido adiposo e (C) no tecido muscular *in vitro*. Tempo de pré-incubação: 30 min. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle.....85

Figura 5.2. Efeito estimulatório da sulfonamida **11** nos canais de K^+ -ATP sobre a captação de glicose no tecido adiposo. Diazoxida (100 μM), agonista dos canais de K^+ -ATP, e a glibenclamida (20 μM), bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Tempo de pré-incubação: 30 min. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle, ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo sulfonamida **11**.86

Figura 5.3. Efeito estimulatório da sulfonamida **11** na via de sinalização da insulina sobre a captação de glicose no tecido adiposo. HNMPA (100 μM), inibidor do receptor da insulina, e wortmanina (1 μM), inibidor da PI 3-K. Tempo de pré-incubação: 30 min. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle; ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo sulfonamida **11**.....87

Figura 5.4. Envolvimento da PLC- γ e da p38 MAPK no efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose. U73122 (1 μ M), inibidor da fosfolipase C e SB203580 (10 μ M) inibidor da p38 MAPK. Tempo de pré-incubação: 30 min. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle controle, ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo sulfonamida **11**. 88

Figura 5.5. Efeito da sulfonamida **11** na via de translocação do GLUT4 sobre a captação de glicose no tecido adiposo. Colcichina (1 mM) agente despolimerizador de microtúbulos e N-etilmaleimida (1mM) um agente bloqueador do transporte vesicular. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle controle, ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo Sulfonamida **11**. 89

Figura 5.6. Hipótese da via de sinalização da sulfonamida **11** sobre a captação de glicose no tecido adiposo. Flechas pontilhadas indicam caminho desconhecido, setas finas indicam a via de sinalização necessária para a captação de glicose no tecido adiposo estimulada pela sulfonamida **11**. K⁺-ATP: canais de potássio sensíveis ao ATP, PLC: fosfolipase C, PI 3-K: proteína cinase 3 fosfatidil-inositol, GSVs: vesículas contendo GLUT4. 90

Figura 5.7. Efeito inibitório da sulfonamida **11** na formação de AGEs fluorescentes em um sistema de BSA/glicose. A, B e C correspondem a 7, 14 e 28 dias de incubação com BSA/glicose, respectivamente. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle controle (BSA), ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo BSA + grupo glicose. 91

Figura 6.1. Curva dose-resposta da acilhidrazona **1** adiministrada por gavagem na curva de tolerância oral à glicose. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico. 108

Figura 6.2. Envolvimento dos canais de K^+ -ATP no efeito estimulatório da acilhidrazona **1** na captação de $^{45}Ca^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. (A), Diazoxida 250 μ M (B), glibenclamida 20 μ M e (C), 1 20 μ M estavam presentes nos últimos 15 min do período de pré-incubação e durante o período de incubação. Tempo de pré-incubação: 60 min; tempo de incubação: 10 min. Média \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes. $^c p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle; $^{#a} p \leq 0,05$ comparado com o grupo acilhidrazona **1**..... 114

Figura 6.3. Envolvimento dos canais de cálcio dependentes de voltage do tipo L e do cálcio dos estoques intracelulares na captação de $^{45}Ca^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. (A), Nifedipina (1 μ M) (B), U-73122 (1 μ M) estavam presentes nos últimos 15 min do período de pré-incubação e durante o período de incubação. Tempo de pré-incubação: 60 min; tempo de incubação: 10 min. Média \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes. $c p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle; $^{#c} p \leq 0,001$ e $^{#b} p \leq 0,01$ comparado com o grupo acilhidrazona **1**..... 116

Figura 6.4. Modelo hipotético do mecanismo de ação da acilhidrazona **1** em células beta. Envolvimento dos canais de K^+ -ATP, dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e do cálcio dos estoques intracelulares. PLC: fosfolipase C, PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, IP3: inositol 1,4,5-trifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína cinase C..... 117

Figura 6.5. Efeito da acilhidrazona **1** na glicemia de ratos diabéticos induzidos por aloxano. Média \pm E.P.M., $n=6$. $^c p \leq 0,001$ comparado com o tempo zero..... 118

Figura 7.1. (A), Estrutura do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (BZD). (B), curva de dose-resposta do BZD. (C), HNMPA, PD 98059, SB 39063 e cicloheximida no músculo sóleo. Os valores são expressos como média \pm SEM, $n = 4$ de 3 experimentos independentes. $^{***} p \leq 0,001$ em comparação com o grupo controle $^{###} p \leq 0,001$ em comparação com o BZD..... 131

Figura 7.2. Efeito do BZD 20 μM na incorporação de (A) ^{14}C -leucina em proteínas e (B) de timidina em DNA ([metil- ^{14}C]), *in vitro* no músculo sóleo. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 4$ ***
 $p \leq 0,001$ em comparação com o grupo controle. 132

Figura 7.3. Efeito de 100 nM wortmanina, 1 μM de colchicina, 1 μM RO 31-8220 e 100 nM de PMA na captação de glicose estimulada pelo BZD no músculo sóleo. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 4$ de 3 experimentos independentes. ***
 $p \leq 0,001$ em comparação com controle ###
 $p \leq 0,001$ em comparação com BZD..... 134

Figura 7.4. Efeito *in vitro* de 20 μM do BZD no imunoconteúdo total de GLUT4 em músculo sóleo incubado por 60 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 4$ de 3 experimentos independentes. **
 $p \leq 0,01$ em comparação com o grupo controle..... 135

Figura 7.5. Efeito *in vitro* (20 μM) e *in vivo* (10 mg/kg) do BZD na localização por fluorescência de GLUT4 no músculo sóleo. Para as análises *in vitro* (painel A e C), tempo de incubação: 60 min, na presença do BZD. Para as análises *in vivo* (painel B e D), em 210 min após administração oral do BZD. Painel E, lâmina de controle negativo no músculo sóleo..... 136

Figura 7.6. Modelo de captação de glicose estimulada pelo ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (BZD) no músculo esquelético. O BZD ativa uma variedade de vias de sinalização, tais como PI 3-K, p38 MAPK e MEK. Translocação de GLUT4 para a membrana do plasma dependente de PI 3-K. p38 MAPK estimula a atividade intrínseca do GLUT4. MEK aumenta atividade nuclear e a síntese de proteínas de novo, que culmina com o aumento da síntese de GLUT4. MEK: proteína cinase da cinase ativada por mitogéno seletiva para serina/treonina, PI 3-K: proteína cinase 3 fosfatidil-inositol, p38 MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno p 38, GLUT4: transportador de glicose 4. 137

Figura 7.7. Efeito *in vivo* de 10 mg/kg do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na atividade específica de (A) sacarase e (B) maltase. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 5$ de 3 experimentos independentes. * $p \leq 0,5$ e ** $p \leq 0,01$ quando comparado ao grupo controle. 138

Figura 7.8. Efeito *in vitro* de diferentes concentrações do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (0,1; 1; 10 e 100 μ M) na atividade específica de (A) sacarase e (B) maltase. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 5$ de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ quando comparado ao grupo controle. 139

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1.** Efeito dos derivados da sulfonamida (10 mg/kg) e glibenclamida (10,1 e 100 mg/kg) na glicemia de ratos *Wistar* em jejum. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^a $p \leq 0,05$; ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico..... 63
- Tabela 4.2.** Efeito dos derivados da sulfonamida (10 mg/kg) nos níveis de insulina séricos em ratos *Wistar* em jejum. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^a $p \leq 0,05$; ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico. *Índice insulinogênico (ng/mg)..... 66
- Tabela 4.3.** Efeito dos derivados da sulfonamida na captação de cálcio em ilhotas pancreáticas..... 68
- Tabela 4.4.** Efeito dos derivados da sulfonamida (10 mg/kg) no conteúdo de glicogênio em ratos *Wistar* em jejum. Cada valor representa a média \pm E.P. M. de quatro determinações. ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico. 76
- Tabela 4.5.** Efeito *in vivo* e *in vitro* dos derivados da sulfonamida na atividade da LDH extracelular no soro e no meio de incubação em ilhotas pancreáticas. Cada valor representa a média \pm E.P. M. de quatro determinações..... 76
- Tabela 6.1.** Efeitos das acilhidrazonas **1**, **2**, **3** e **4** (10 mg/kg) na curva de tolerância oral à glicose. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações em triplicata. ^a $p \leq 0,05$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico..... 109
- Tabela 6.2.** Efeitos das acilhidrazonas **1** e **4** (10 mg/kg) nos níveis de secreção de insulina. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações em triplicata. ^a $p \leq 0,05$; ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico..... 111

Tabela 6.3. Curva dose-resposta da acilhidrazona **1** e da glibenclamida na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações em triplicata. ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle..... 112

Tabela 6.4. Efeito das acilhidrazonas **1** e **4** (10 mg/kg) no conteúdo de glicogênio em ratos. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico. Resultados expressos em mg/g de tecido. 119

Tabela 6.5. Efeito da acilhidrazona **1** 20 μM na captação da glicose no músculo sóleo. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^b $p \leq 0,01$ comparado com o grupo controle. 119

Tabela 6.6. Efeito da acilhidrazona **1** e **4** (10 mg/kg) na atividade da LDH extracelular. Cada valor representa a média \pm E.P. M. de quatro determinações. 120

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 4.1. Estratégia da síntese de derivados da sulfonamida.....	52
Esquema 4.2. Síntese das sulfonamidas. (a) Piridina. * compostos inéditos.....	53
Esquema 6.1. Estrutura das acilhidrazonas.....	101

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
1.1 Diabetes melito tipo 1	28
1.2 Diabetes melito tipo 2	29
1.3 Síntese de insulina	34
1.4 Secreção de insulina	35
1.4.1 Canais de potássio dependentes de ATP e a secreção de insulina.....	37
1.4.2 Canais de cálcio dependentes de voltagem e a secreção de insulina.....	37
1.5 Sinalização intracelular da insulina e os efeitos metabólicos e fisiológicos.....	38
1.5.1 Captação da glicose.....	39
1.5.2 Síntese de glicogênio.....	40
1.6 Modelos experimentais.....	41
1.7 Histórico das sulfonamidas e sulfonilureias como alvos na homeostasia da glicose	42
1.7.1 Eleição da glibenclamida como fármaco de destaque no tratamento do diabetes	43
1.7.2 Ações da glibenclamida	43
1.8 Acilhidrazonas como alvos terapêuticos atraentes	44
1.9 Justificativa	45
2. OBJETIVOS	46

2.1	Objetivo geral.....	46
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3.	METODOLOGIA	47
4.	EFEITOS ANTI-DIABÉTICOS DE DERIVADOS DA SULFONAMIDA BASEADOS EM UM FRAGMENTO ESTRUTURAL DAS SULFONILUREIAS	48
4.1	Introdução	51
4.2	Química.....	53
4.2.1	Dados físico-químicos dos compostos sintetizados.....	53
4.3	Protocolos experimentais	54
4.3.1	Materiais	54
4.3.2	Síntese dos derivados da sulfonamida	54
4.3.3	Animais experimentais	56
4.3.4	Estudo do efeito dos derivados da sulfonamida na curva de tolerância oral à glicose.....	57
4.3.5	Efeito da sulfonamida 5 na glicemia em ratos diabéticos.....	57
4.3.6	Ensaio de insulina sérica.....	57
4.3.7	Isolamento de ilhotas pancreáticas	58
4.3.8	Experimentos com captação de cálcio.....	59
4.3.9	Extração e ensaio das dissacarídeos.....	59
4.3.10	Medidas de glicogênio muscular e hepático.....	60
4.3.11	Ensaio da lactato desidrogenase	61
4.3.12	Análises estatísticas	61
4.4	Resultados e discussão	61
4.4.1	Efeito de derivados da sulfonamida na glicemia	61
4.4.2	Efeito de derivados da sulfonamida na secreção de insulina	65
4.4.3	Efeito de derivados de sulfonamida na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas	67

4.4.4	Efeito de derivados da sulfonamida na atividade de dissacaridases.....	72
4.4.5	Efeito dos derivados da sulfonamida no conteúdo de glicogênio	75
4.4.6	Efeito dos derivados da sulfonamida na atividade da LDH .	76
4.5	Conclusões.....	77
5.	SULFONAMIDA 11 ESTIMULA A CAPTAÇÃO DE GLICOSE VIA CANAIS DE POTÁSSIO DEPENDENTES DE ATP78	
5.1	Introdução.....	81
5.2	Materiais e Métodos	82
5.2.1	Materiais.....	82
5.2.2	Os animais experimentais.....	82
5.2.3	Captação de glicose no músculo sóleo e tecido adiposo	83
5.2.4	Formação de produtos finais de glicação avançada nos sistemas de albumina bovina sérica/glicose.....	83
5.2.5	Análises estatísticas.....	84
5.3	Resultados	84
5.3.1	Mecanismo de ação da sulfonamida 11 na captação de glicose	84
5.4	Discussão	92
5.5	Conclusão	94
6.	AS ACILHIDRAZONAS CONTRIBUEM PARA HOMEOSTASIA DA GLICOSE ATRAVÉS DE DOIS ALVOS FISIOLÓGICOS	95

6.1	Introdução.....	99
6.2	Protocolos Experimentais.....	102
6.2.1	Materiais	102
6.2.2	Animais experimentais	102
6.2.3	Efeito das acilhidrazonas na curva de tolerância oral à glicose 103	
6.2.4	Ensaio de insulina sérica.....	103
6.2.5	Isolamento de ilhotas pancreáticas	104
6.2.6	Experimentos com captação de cálcio.....	104
6.2.7	Efeito das acilhidrazonas na glicemia de ratos diabéticos..	105
6.2.8	Medidas de glicogênio muscular e hepático.....	105
6.2.9	Captação de glicose no músculo sóleo	106
6.2.10	Ensaio da lactato desidrogenase	106
6.2.11	Análises estatísticas	107
6.2.12	Síntese química.....	107
6.3	Resultados e discussão	107
6.3.1	Estudos do efeito das acilhidrazonas na curva de tolerância oral à glicose	107
6.3.2	Efeito das acilhidrazonas nos níveis de insulina sérica	110
6.3.3	Efeito da acilhidrazona na captação de Ca^{2+} em ilhotas pancreáticas.....	112
6.3.4	Estudo do efeito da acilhidrazona na glicemia em ratos diabéticos	117
6.3.5	Efeito das acilhidrazonas no conteúdo de glicogênio.....	118
6.3.6	Efeito da acilhidrazona 1 na captação da glicose em músculo sóleo de ratos.....	119
6.3.7	Efeito das acilhidrazonas na atividade da LDH.....	119
6.4	Conclusão	120
7.	MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO (2E)-N'-(1'-NAFTIL)- 3,4,5-TRIMETHOXBENZOHIDRAZIDA NA CAPTAÇÃO DE GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	121

7.1	Introdução	124
7.2	Protocolos Experimentais	125
7.2.1	Materiais.....	125
7.2.2	Animais experimentais	126
7.2.3	Captação de glicose no músculo sóleo	126
7.2.4	Estudos da síntese de proteína e da incorporação de timidina no DNA em músculo sóleo.....	127
7.2.5	Gel de poliacrilamida para eletroforese e análise de imunotransferência.....	127
7.2.6	Análise por imunofluorescência.....	128
7.2.7	Ensaio da atividade das dissacarídes.....	129
7.2.8	Análises estatísticas.....	129
7.3	Resultados	129
7.3.1	Mecanismo de ação do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5- trimetoxibenzohidrazida na captação de glicose no músculo sóleo de ratos	129
7.3.2	Efeito do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5- trimetoxibenzohidrazida na síntese de proteínas e atividade nuclear	132
7.3.3	Efeito do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5- trimetoxibenzohidrazida na translocação de GLUT4, imunoconteúdo e localização da membrana plasmática no músculo sóleo	133
7.3.4	7.3.4 Efeito do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5- trimetoxibenzohidrazida na atividade das dissacarídes	138
7.4	Discussão	140
7.5	Conclusões.....	143
8.	DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS	144
9.	CONCLUSÃO GERAL.....	146

10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
------------	--	------------

1. INTRODUÇÃO

O diabetes melito (DM) é um dos mais importantes problemas de saúde mundial. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente existem 346 milhões de pessoas com diabetes no mundo e o número de mortes por diabetes duplicará entre 2005 e 2030 (OMS, 2013). A população brasileira chegou ao número estimado de 13,4 milhões de diabéticos no Brasil (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2011). O DM está associado ao desenvolvimento de complicações, incluindo a doença cardiovascular, nefropatia, neuropatia e retinopatia (TAN e MACLEAN, 1995). A classificação do DM atualmente está baseada na etiologia da doença e a divide clinicamente em diabetes melito tipo 1 (DM1), diabetes melito tipo 2 (DM2), DM gestacional e outros tipos de diabetes tais como o DM autoimune latente do adulto (LADA, do inglês: latente autoimmune diabetes in adults). (IFD, 2012).

1.1 DIABETES MELITO TIPO 1

Pessoas com diabetes tipo 1 constituem aproximadamente 10% dos 10 milhões de diabéticos nos Estados Unidos da América. Embora a natureza exata do insulto não esteja clara, o DM1 é caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas devido ao ataque autoimune mediado pelas células T (ATKINSON e EISENBARTH, 2001). Ao longo dos anos, este ataque autoimune leva à depleção gradual da população de células beta (KLOPPPEL et al., 1985). Os sintomas aparecem abruptamente quando 80 a 90% das células beta foram destruídas. Neste ponto, o pâncreas falha em responder adequadamente à ingestão de glicose, e a terapia com insulina se torna necessária para restaurar o controle metabólico e prevenir a cetoacidose (HANLEY et al., 2009).

As anormalidades metabólicas do DM1 resultam da deficiência da insulina, que afeta de forma mais marcante o metabolismo de três tecidos: fígado, músculo e tecido adiposo. Níveis elevados de glicose e cetonas no sangue são características do diabetes melito tipo 1 não tratado. A hiperglicemia é causada por um aumento na produção hepática de glicose, juntamente com diminuição na utilização periférica (CHAMPE, HARVEY e FERRIER, 2010). A cetose resulta da mobilização aumen-

tada de ácidos graxos do tecido adiposo, combinada com aceleração hepática na beta-oxidação de ácidos graxos e na síntese de 3-hidroxibutirato e acetoacetato (NEWTON e RASKIN, 2012). Os ácidos graxos que chegam ao fígado e não são oxidados ou utilizados na síntese de corpos cetônicos, são convertidos em triacilgliceróis, que são empacotados e secretados em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Com os níveis de insulina baixos no DM1, diminui a síntese da enzima lipase lipoteica, que cataliza a degradação das lipoproteínas e quilomícrons no tecido adiposo. Isto resulta em um aumento dos níveis plasmáticos de quilomicras e VLDL, chamado de hipertriacilglicerolemia (EGAN et al., 1992; WANG et al., 2008).

1.2 DIABETES MELITO TIPO 2

O DM2 é a forma mais comum da doença, atingindo cerca de 90% da população diabética dos EUA. A doença se caracteriza pela falha da célula beta pancreática em compensar a reduzida sensibilidade periférica à insulina, aumentando a secreção do hormônio (PICK et al., 1998; WEIR et al., 2001). Dessa forma, a hiperglicemia resultante está relacionada à diminuição na captação de glicose pelos tecidos periféricos e a um aumento na produção hepática de glicose. Em indivíduos com função da célula beta normal, aumentos na demanda de insulina devido à resistência periférica ao hormônio são compensados por um aumento coordenado na secreção de insulina, mantendo assim os níveis de glicose plasmática dentro da normalidade. Em indivíduos geneticamente predispostos ao DM2, a falha da célula beta em compensar o aumento na demanda resulta em progressiva elevação dos níveis de glicose e determina o início do quadro clínico da doença. Desse modo, o DM2 é caracterizado por hiperglicemia, resistência à insulina e relativa diminuição na secreção de insulina (DONATH e HALBAN, 2004).

A resistência à insulina e a diminuição da secreção da insulina são as anormalidades metabólicas presentes em pacientes com DM2. A hiperglicemia é causada por um aumento da produção hepática de glicose, combinado com a diminuição da captação da glicose pelo músculo e tecido adiposo. Além disso, ocorre diminuição da síntese e do conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Em geral, a cetose é mínima ou ausente, pois a presença de insulina, mesmo com resistência a insulina, a cetogênese hepática diminui (NEWTON e RASKIN). A hipertriacilgli-

cerolemia é causada pela diminuição da lipase lipoproteica, resultando em níveis elevados de quilomícrons e VLDL (EGAN et al., 1992; WANG et al., 2008).

Figura 1.1: Principais fatores que contribuem para a hiperglicemia no DM2. Fonte: Adaptado de DE FRONZO, 1999.



A diminuição dos níveis de insulina induz um aumento anormal da atividade e expressão das dissacaridases intestinais (DYER et al., 2002; LIU et al., 2011). As dissacaridases são responsáveis pela digestão final dos carboidratos que ocorre no epitélio mucoso do jejuno superior. As dissacaridases compreendem a isomaltase, maltase, sacarase e a lactase que são secretadas pelo lado luminal da membrana em forma de escova das células da mucosa intestinal e permanecem associadas a essa membrana. Por exemplo, a isomaltase rompe a ligação $\alpha(1\sim6)$ da isomaltose, e a maltase hidrolisa a maltose, ambas produzindo glicose. A sacarase hidrolisa a sacarose, produzindo a glicose e a frutose e a lactase (β -galactosídase) hidrolisa a lactose, produzindo a galactose e a glicose.

(CHAMPE, HARVEY e FERRIER, 2010). O duodeno e o jejuno superior absorvem a maior parte dos glicídeos da dieta. A captação de glicose pelas células intestinais não requer insulina. Por isso, a combinação do aumento da atividade e níveis protéicos das dissacaridases, associados a uma maior absorção dos glicídeos da dieta, contribui para a hiperglicemia no DM2 (TANDON, SRIVASTAVA e PANDEY, 1975). Diferentes glicídeos são absorvidos por meio de diferentes mecanismos. Por exemplo, a galactose e a glicose são transportadas para o interior das células mucosas por um processo ativo, que requer energia, envolvendo uma proteína transportadora específica e necessitando de uma captação concomitante de íons sódio. A absorção de frutose requer um transportador de monossacarídeo independente de sódio (GLUT5). Todos os três monossacarídeos são transportados das células mucosas intestinais para a circulação porta por outro transportador, o GLUT2 (CHAMPE, HARVEY e FERRIER, 2010). Deste modo a diminuição da captação da glicose no intestino pode ser provocada pela diminuição da atividade das dissacaridases intestinais.

A função das células beta pode estar reduzida em 50% no momento do diagnóstico do DM2. Ao longo do tempo, a função reduz progressivamente cerca de 6% ao ano. A disfunção das células beta causa anormalidades no metabolismo do DM2. Estudos indicam que além do mecanismo de perda natural das células beta, a taxa de apoptose celular aumenta, enquanto que a taxa de renovação celular permanece inalterada (BUTLER et al., 2003). A secreção de insulina possui duas fases (HUANG e JOSEPH, 2014), sendo que a primeira fase de secreção de insulina está prejudicada no DM2 (Gerich, 1998; Del Prato, MARCHETTI e BONADONNA 2002). Além disso, parece que o ambiente hiperglicêmico e hiperlipidêmico que é encontrado em DM2 é diretamente tóxico para as células beta pancreáticas (MAEDLER et al., 2001; EL-ASSAAD et al., 2003). Além disso, a quantidade de massa de células beta pode estar normal (RITZEL et al., 2006), sendo que a deficiência pode ser funcional (KLOPPPEL et al., 1985; GUIOT et al., 2001). Estes eventos resultam na falha parcial ou total da secreção da insulina. Portanto a preservação da função das células beta é um alvo farmacológico para a terapia do DM.

Figura 1.2: Perda da função pancreática com o decorrer do tempo de diabetes. Fonte: Adaptado de HOLMANN, 1998.

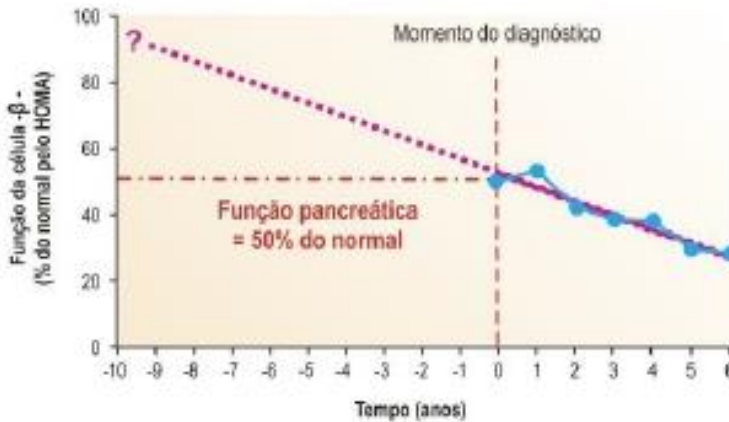
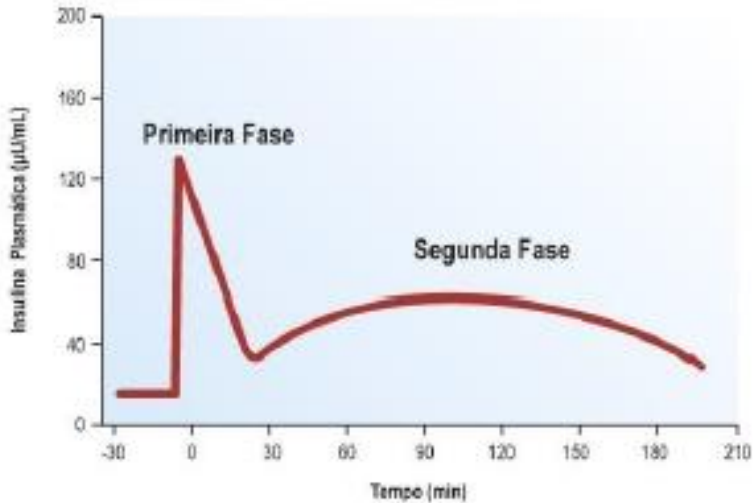


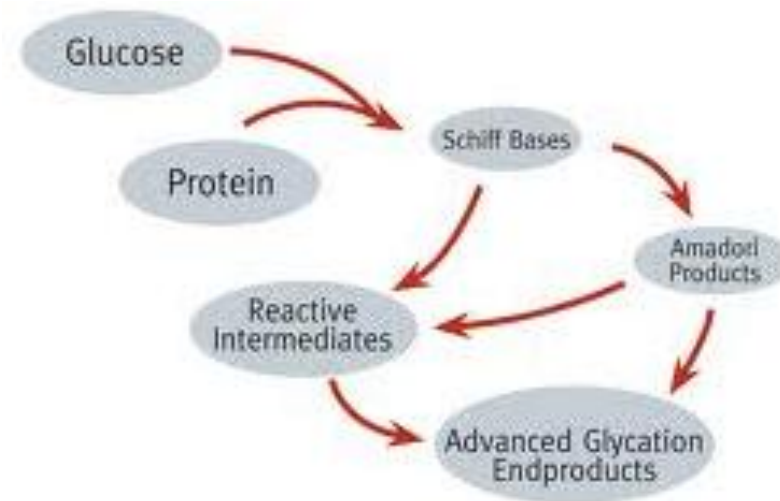
Figura 1.3: As duas fases da secreção fisiológica da insulina. Fonte: Adaptado de YANG e BERGGREN, 2006.



Hiperglicemia crônica é a característica mais comum de todas as formas do DM. Entre as hipóteses que explicam como a hiperglicemia crônica conduz aos danos celulares e teciduais observados nessa doença, a da formação dos AGEs é considerada uma das mais importantes (BROWNLEE, 2001; PEPPA, URIBARRI e VLASSARA, 2003)

A reação de formação de AGEs pode ser separada em três fases. Na primeira, ocorre a glicação não enzimática, em que o grupamento carbonila do açúcar redutor se condensa com o grupo amino livre da proteína, formando a base de Schiff que, após sofrer rearranjo, origina os produtos de Amadori, estruturalmente mais estáveis. A hemoglobina glicada e a frutossamina são conhecidos exemplos de produtos de Amadori. Na fase intermediária, os produtos de Amadori são transformados em uma série de compostos dicarbonílicos como glioxal, metilglioxal e glicolaldeído através de oxidações e desidratações. A última fase compreende a reação da dicarbonila novamente com os grupos amina primárias acessíveis, formando os compostos irreversíveis chamados AGEs. A inibição de qualquer uma destas três fases pode reduzir a formação dos AGEs e beneficiar o tratamento de doenças cardiovasculares, nefropatia, neuropatia e retinopatia (TAN e MACLEAN, 1995; PEPPA, URIBARRI e VLASSARA, 2003).

Figura 1.4: Formação de AGES. Fonte: Adaptado de PEPPA, URI-BARRI e VLASSARA, 2003.



1.3 SÍNTESE DE INSULINA

Nos mamíferos, a insulina é sintetizada no pâncreas dentro das células beta das ilhotas de Langerhans. Um milhão a três milhões de ilhotas de Langerhans (ilhotas pancreáticas) formam a parte endócrina do pâncreas. A porção endócrina representa apenas 2% da massa total do pâncreas. Dentro das ilhotas de Langerhans, as células beta constituem 60-80% de todas as células (STEINER et al., 2001).

A biogênese da insulina inicia com a síntese de pré-pro-insulina no retículo endoplasmático rugoso e a conversão de pré-pro-insulina a pró-insulina. A pró-insulina é empacotada no complexo de Golgi em grânulos secretores imaturos. Estes grânulos imaturos se tornam ácidos através de uma bomba de prótons dependente de trifosfato de adenosina (ATP) e a pró-insulina sofre clivagem proteolítica, resultando na formação de insulina e peptídeo-C. Durante o processo de maturação dos grânulos, a insulina é cristalizada com zinco e cálcio na forma de grânulos com núcleo denso (MICHAEL et al., 1987). A liberação de insulina envolve a movimentação desses grânulos, via microtúbulos, para a

membrana plasmática e a consequente fusão exocitótica (XU et al., 1999; ELIASSON, 2008).

A secreção de insulina *in vivo* estimulada pela glicose tipicamente segue um curso de tempo bifásico (HUANG e JOSEPH, 2014). Pouco depois da elevação da concentração de glicose, um estímulo agudo da secreção de insulina é observado, referido como "secreção de insulina de primeira fase", que é seguido por uma estimulação de desenvolvimento gradual e secundário, chamado "secreção de insulina de segunda fase" (RORSMAN et al., 2000).

1.4 SECREÇÃO DE INSULINA

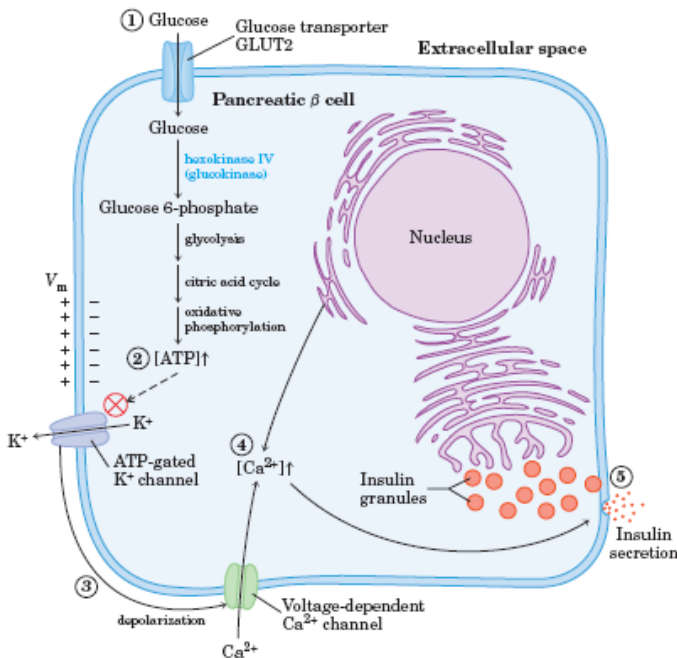
A secreção de insulina é regulada principalmente pela concentração de glicose no líquido intersticial que cerca as células beta das ilhotas pancreáticas. A principal cascata de sinalização da secreção de insulina é estimulada pela glicose. O GLUT2 permite a entrada de glicose na célula beta, que é metabolizada aumentando da razão ATP/ADP. O aumento dos níveis de ATP culmina no bloqueio dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K^+ -ATP) localizados na membrana plasmática e resulta na despolarização da membrana, facilitando a entrada de cálcio extracelular devido a uma abertura dos canais de cálcio dependentes da voltagem (CCVD). O aumento do influxo de cálcio extracelular para o compartimento citosólico e a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares são fundamentais para o transporte em vesículas com grânulos de insulina para a membrana plasmática, tanto na fusão, como na liberação da insulina na circulação (ASHCROFT e RORSMAN, 1989; MILLER et al., 1992).

Estes eventos descrevem a primeira fase da cascata de sinalização da secreção de insulina estimulada pela glicose, dependente do canal K^+ -ATP e do influxo de cálcio que correspondem à secreção dos grânulos de insulina pré-formados localizados próximo à membrana citoplasmática. Estes grânulos pertencem ao grupo de vesículas prontamente disponíveis para fusão com a membrana plasmática (RPP) e caracteristicamente contêm menos que 5% do número total de grânulos (PARSONS et al., 1995).

A segunda fase de secreção de insulina ocorre através do aumento progressivo e da potencialização do influxo de cálcio, promovendo a preparação, o recrutamento e o transporte de novos grupos de grânulos para a exocitose. Esta fase, também chamada de amplificação, é conhe-

cida como “cascata de sinalização da secreção de insulina estimulada pela glicose independente do canal de K^+ -ATP”, pois depende da presença crescente de cálcio intracitoplasmático do citosol para vesícula (STRAUB et al., 2001). Aproximadamente 95-99% dos grânulos de insulina são liberados nesta fase, e são denominados não disponíveis ou de segunda fase. Estes grânulos necessitam ser quimicamente modificados, ou mesmo fisicamente translocados, para se tornarem imediatamente disponíveis para fusão com a membrana plasmática e obter a capacidade de liberação (XU et al., 1999; ELIASSON, 2008).

Figura 1.5: Mecanismo de secreção de insulina. Fonte: Adaptado de NELSON e COX, 2011.



1.4.1 Canais de potássio dependentes de ATP e a secreção de insulina

Está bem estabelecido que dois tipos de canais iônicos são particularmente importantes para o início da secreção de insulina: os K^+ -ATP e os CCDV (ASHCROFT e RORSMAN, 1989). Geralmente, os K^+ -ATP estão associados ao metabolismo da glicose e a sinalização elétrica da membrana (ASHCROFT, HARRISON e ASHCROFT, 1984; AGUILAR-BRYAN et al., 1995). Estes canais funcionam através de receptores específicos, que são proteínas da membrana celular que formam um complexo funcional octamérico constituído por dois tipos de subunidades proteicas: Kir6.x, que possui sítios de ligação para o ATP, e um receptor de sulfoniluréia (SUR) (ASHCROFT e RORSMAN, 1989; BRYAN et al., 2005). Foram identificados dois genes codificando as subunidades Kir6 (Kir6.1 e Kir6.2) e dois genes codificando as subunidades SUR (SUR1 e SUR2) (AGUILAR-BRYAN et al., 1995; SAKURA et al., 1995). Kir6.x pertence à família de canais que retificam interiormente K^+ (Kir) e sua forma se assemelha a um tetrâmero para formar o poro do canal. A ligação do ATP aos domínios intracelulares desta subunidade produz a inibição do canal (TUCKER et al., 1997). SUR é um membro da família transportador ABC, com 17 hélices transmembrana (TMs), organizados como um grupo de 5 TMs e dois domínios de ligação intracelular contendo sequências consenso para a ligação de nucleotídeos e hidrólise (TUSNADY et al., 1997; CONTI et al., 2001).

1.4.2 Canais de cálcio dependentes de voltagem e a secreção de insulina

Os CCDV são amplamente expressos em vários tipos celulares. Nas células beta pancreáticas, foram identificados seis subunidades de CCDV, incluindo CCDV1.2, CCDV1.3, CCDV2.1, CCDV2.2, CCDV2.3 e CCDV3.1. De acordo com as propriedades farmacológicas e eletrofisiológicas, podem distinguir-se seis tipos de canais de cálcio: L, N, P, Q, R e T. (DAVALLI et al., 1996; SCHULLA et al., 2003; YANG e BERGGREN, 2005). Estudos demonstram que 60-80% da secreção de insulina induzida pela glicose estão atribuídos ao CCDV do tipo 1 (CCDV1) em ilhotas humanas, e de ratos (DAVALLI et al., 1996; SCHULLA et al., 2003). Foi demonstrado que os canais CCDV1 participam da regulação de ambas as fases da secreção de insulina e desempenham um papel mais evidente no desencadeamento da liberação da insu-

lina durante a primeira fase em ilhotas humanas e de camundongos (DAVALLI et al., 1996). A atividade deste canal é potencializada pela proteína cinase A (PKA) e pela proteína cinase C (PKC) (DOYLE e EGAN, 2003). Além disso, a PKC aumenta a eficiência do cálcio (Ca^{2+}) citosólico liberação das vesículas contendo grânulos de insulina (YANG e BERGGREN, 2006).

1.5 SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DA INSULINA E OS EFEITOS METABÓLICOS E FISIOLÓGICOS

O receptor da insulina pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento. A sinalização intracelular da insulina começa com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade cinase, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta, denominado receptor de insulina (IR) (SALTIEL e KAHN, 2001). A ativação do IR resulta na fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e 2 (IRS-2) (WHITE, 1998). A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de ligação para outra proteína citosólica denominada fosfatidil-inositol 3-cinase (PI 3-K), promovendo a ativação. A PI 3-K é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e efeitos metabólicos estimulados pela insulina (SAAD et al., 1993). A PI 3-K foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A fosforilação dos sítios de tirosina das proteínas IRSs ao domínio SH2 (domínio 2 homólogo ao Src) da subunidade p85 da PI 3-K ativa o sítio catalítico associado (BACKER et al., 1992; MYERS et al., 1992). A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinositídeos na posição 3 do anel de inositol, produzindo fosfatidil-inositol -3 fosfato, fosfatidil-inositol -3,4-difosfato e fosfatidil-inositol -3,4,5-trifosfato. A ativação da PI 3-K aumenta a fosforilação em serina da proteína cinase B (Akt).

A Akt é uma serina treonina cinase que possui três isoformas (Akt1, Akt2 e Akt3) todas expressas em tecido muscular (DATTA, BRUNET e GREENBERG, 1999). Animais deficientes de Akt (nocaute da Akt) demonstraram características de diabetes grave, tais como hipertrofia da célula beta, aumento na produção hepática de glicose, diminuição da homeostase da glicose e exacerbação da hiperglicemia. A proteína Akt fosforila e ativa vários alvos metabólicos. Esta proteína estimula a captação de glicose, a síntese de glicogênio e de proteínas. Por outro lado, a Akt possui funções não metabólicas, tais como a inibição da a-

poptose e da degradação proteica em músculo esquelético através da fosforilação e inativação da proteína pró-apoptótica Bad e fatores de transcrição como a FoxO, respectivamente (OGG et al., 1997). Portanto, a via PI 3-k/Akt tem um importante papel nos efeitos metabólicos da insulina.

1.5.1 Captação da glicose

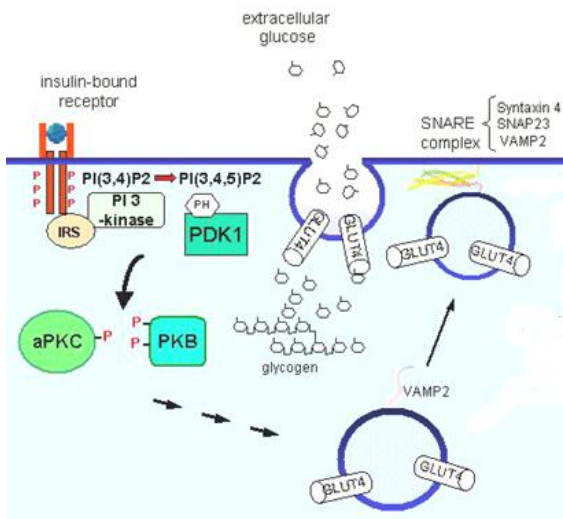
O estímulo do transporte de glicose pela insulina no músculo e no tecido adiposo é essencial para a manutenção da homeostase da glicose. O principal transportador de glicose que medeia esta captação é o transportador de glicose 4 (GLUT4) (BOGAN, 2012).

A insulina estimula a translocação de GLUT4 por ligação a subunidades alfa do seu receptor, levando à autofosforilação da subunidade beta e à ativação da sua atividade tirosina cinase intrínseca. A ativação do IRS permite a interação com proteínas contendo porções SH2 como a PI 3-K, que é ativada através da fosforilação da subunidade regulatória p85. Acredita-se que a ativação da PI 3-K pela insulina é essencial para a estimulação da translocação de GLUT4. Um grande número de estudos mostraram que os inibidores da PI 3-K (wortmanina e LY294002) ou a sub-expressão mutante da subunidade adaptadora p85 da PI 3-K, sem a capacidade de se ligar à subunidade catalítica p110, inibe completamente a translocação do GLUT4 e o transporte de glicose mediada por insulina em adipócitos e células do músculo esquelético (revisão em BOGAN, 2012). A PI 3-K catalisa a formação do segundo mensageiro intracelular PIP3 que irá regular a localização e atividade da cinase dependente de fosfatidil-inositol 1 e 2 (PDK1 e PDK2, respectivamente), as quais fosforilam a Akt e as isoformas atípicas das proteínas cinases C (PKC ξ e PKC λ) (TANIGUCHI, EMANUELLI e KAHN, 2006; LIU et al., 2006). A fosforilação da Akt desencadeia a captação de glicose através da translocação do GLUT4 para a membrana celular. Esse efeito parece ser mediado pela fosforilação da proteína AS 160, que possui domínio de proteína ativadora de GTPases (GAP). A AS160 tem ações específicas para proteínas da família Rab nos diversos aspectos do tráfego de vesículas intracelulares, além de estar envolvida na reorganização do citoesqueleto (WATSON e PESSIN, 2007). Em adição, este processo envolve os microtúbulos e a actina para conduzir as vesículas contendo GLUT4 (GSVs) para a membrana plasmática.

Na periferia da célula, as GSVs amarram (tether), engatam (dock) e se fundem com a membrana plasmática assistida pelo complexo de

exocitose seguido pelo envolvimento do complexo SNARE - um receptor de proteínas de fixação à proteína de fusão sensível a N-etilmaleimida solúvel. Algumas dessas proteínas que pertencem a este complexo (VAMP2, sintaxina 4, SNAP23, munc18 e Synip) regulam a fusão das vesículas com a membrana plasmática. A insulina recruta as vesículas de GLUT4 em direção à membrana através da fosforilação e ativação de VAMP2 na superfície das vesículas (Bogan, 2012). Essa proteína interage com SNAP23 e sintaxina 4 na membrana da célula, formando um complexo ternário. Concomitantemente à formação desse complexo, ocorre a dissociação da proteína synip da sintaxina 4 e a mudança conformacional de munc18c, expondo o domínio de ligação do complexo ternário à VAMP2, promovendo a fusão das vesículas com a membrana (CHANG, CHIANG e SALTIEL 2004; WATSON e PES-SIN, 2007).

Figura 1.6: Vias de sinalização da insulina mediando a captação de glicose. Fonte: Adaptado de GRUSOVIN e MACAULAY, 2003.



1.5.2 Síntese de glicogênio

O glicogênio é sintetizado em quase todos os tecidos animais, mas os maiores depósitos estão presentes no músculo esquelético e fígado. O glicogênio é armazenado em grânulos intracelulares, que também

contêm as enzimas que catalisam as reações para a síntese e a degradação. Constitui a principal forma de reserva de polissacarídeos nos tecidos animais (ROTHMAN et al., 1991).

A insulina inibe a produção e liberação de glicose no fígado através do bloqueio da gliconeogênese e glicogenólise. Este hormônio estimula o acúmulo de glicogênio através do aumento do transporte de glicose no músculo e a síntese de glicogênio no fígado e no músculo através da via de desfosforilação da glicogênio sintetase. Após estímulo com insulina, a Akt fosforila e inativa a cinase sintetase de glicogênio 3 (GSK-3), o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio sintetase, aumentando sua atividade (CHAMPE, HARVEY e FERRIER, 2010). A insulina também ativa a proteína fosfatase 1 (PP1) por um processo dependente da PI 3-K, que desfosforila a glicogênio sintetase diretamente (BRADY, NAIRN e SALTIEL 1997). Na neoglicogênese, a insulina inibe diretamente a transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK), enzima chave no controle desse processo. O hormônio também diminui a taxa de transcrição do gene que codifica a frutose-1,6-bisfosfatase e a glicose-6-fosfatase e aumenta a transcrição de genes de enzimas glicolíticas como a glicocinase e a piruvato cinase (BERGMAN, 1997).

1.6 MODELOS EXPERIMENTAIS

Embora as etiologias difiram entre DM1 e DM2, ambas as formas são caracterizadas por uma deficiência relativa na massa e na função das células beta e por algumas anormalidades metabólicas em comum (HANLEY, 2009). Assim, estudos que têm por objetivo investigar mecanismos de alvos para novas intervenções terapêuticas no sentido de contribuir para o tratamento do diabetes, são de grande importância no que concerne à patogênese desta doença. Inicialmente, novos agentes com potencial terapêutico são avaliados com o princípio de normalizar a glicemia (DAMAZIO et al., 2010). Isto pode ocorrer através de diferentes alvos tais como; pelo aumento da secreção de insulina das células beta (secretagogos), aumento da resposta à insulina em tecidos alvo (sensibilizadores da insulina), ou pela substituição da insulina em falta (compostos exógenos insulínomiméticos) (HANLEY, 2009). Além destes, alvos no intestino que visam à diminuição da atividade das dissacarídeses, bem como a diminuição da captação de glicose intestinal e a secreção de incretinas polipeptídeo insulínico dependente de glico-

se (GIP) e peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), também podem normalizar a glicemia em estados diabéticos (KITAHARA et al., 2010).

No modelo experimental hiperglicêmico, ratos *Wistar* adultos jovens (48-50 dias) que passaram por um jejum de 16 h, recebem uma sobrecarga de glicose (4g/kg de peso corporal) por via oral. A partir disto, coletas de sangue são realizadas nos tempos 0, 15, 30, 60 e 180 min para avaliar a glicemia, pelo método da glicose oxidase. Os tratamentos são administrados 30 min antes da sobrecarga de glicose (ALBERTON et al., 2008; DAMAZIO et al., 2010). Neste modelo experimental, a substância que demonstrar redução da glicemia, pode atuar através de diversos alvos, por exemplo, como secretagogo de insulina (FREDERICO et al., 2013), sensibilizador da insulina (FREDERICO et al., 2013), insulinomimético (ZANATTA et al., 2008) ou atuar em alvos no intestino (KITAHARA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011). Se a substância for insulinomimética, apresentará ação em outro modelo experimental, como o de diabetes induzido por aloxano, que se assemelha ao DM1 (FEDERIUK et al., 2004). Se a substância não apresentar efeito neste modelo, existem as demais possibilidades para serem testadas (KITAHARA et al., 2010; FREDERICO et al., 2011; FREDERICO et al., 2013).

1.7 HISTÓRICO DAS SULFONAMIDAS E SULFONILUREIAS COMO ALVOS NA HOMEOSTASIA DA GLICOSE

A história das sulfonamidas hipoglicemiantes começou na França em 1942. Durante a segunda guerra mundial, devido à escassez de alimentos em Montpellier, muitas pessoas se alimentavam com comida estragada ou mesmo alimentos contaminados com bactérias, como o marisco. Muitos casos de febre tifóide foram diagnosticados e tratados por Marcel Janbon na Clínica da Faculdade de Medicina de Montpellier, com a nova sulfonamida (VK 57 ou RP 2254). Reações adversas foram observadas, tais como convulsões, coma prolongado e uma grande queda da glicose no sangue (LOUBATIÈRES-MARIANI, 2007). Estas observações foram logo ampliadas, e a 1-butil-3-sulfonilureia (carbutamida) se tornou a primeira sulfonilureia clinicamente útil para o tratamento do diabetes (KLEINSORGE, 1988). O uso deste composto foi posteriormente interrompido por causa dos efeitos adversos na medula óssea, mas levou ao desenvolvimento de toda a classe das sulfonilureias (KLEINSORGE, 1988; LOUBATIÈRES-MARIANI, 2007). Em 1992,

Jean-Claude Henquin demonstrou que a sequência de eventos desencadeados por RP 2254 em células beta é semelhante à induzida pelas sulfonilureias da primeira ou segunda geração (HENQUIN, 1992). Assim, o RP 2254, proposto por Auguste Loubatières no tratamento de certas formas de diabetes, foi a primeira das sulfonamidas hipoglicemiantes orais utilizada no tratamento do DM2 (LOUBATIÈRES-MARIANI, 2007).

1.7.1 Eleição da glibenclamida como fármaco de destaque no tratamento do diabetes

Na classe das sulfonilureias, a glibenclamida está entre um dos medicamentos mais utilizados nos Estados Unidos para o tratamento do DM2 (PATEL et al., 2007). Está sulfonilureia induz melhor atividade secretagoga de insulina em relação a sua classe (GENG et al., 2003). A glibenclamida continua a ser uma terapia eficaz para o diabetes que demonstra benefícios do controle glicêmico estrito com um efeito hipoglicemiante potente e prolongado, além de ser o tratamento de melhor custo-efetivo para população ambulatorial com diagnóstico de DM2 nos estágios iniciais da doença (DÍAZ DE LEÓN-CASTAÑEDA et al., 2012). Além disso, a glibenclamida é um dos únicos antidiabéticos orais constantes da Lista Modelo de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011). No Brasil, faz parte do programa Farmácia Popular; do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013) e da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Renome - 2010 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

1.7.2 Ações da glibenclamida

A glibenclamida melhora o controle glicêmico, atuando na secreção e na ação da insulina (TSIANI et al., 1995; LUZI e POZZA 1997; GENG et al., 2003 FUKUEN et al., 2005; SCARSI et al., 2007; TING e KHASAWNEH 2010, FREDERICO et al., 2013). O efeito predominante da glibenclamida está na secreção de insulina (PFEIFER et al., 1980), enquanto que o efeito na sensibilidade à insulina pode ser mediado pela melhoria do controle metabólico ou através de um efeito periférico direto (TSIANI et al., 1995; LUZI e POZZA 1997; SCARSI et al., 2007; TING e KHASAWNEH, 2010). O tratamento crônico pode levar a uma concentração de insulina semelhante ao início do tratamento. O alvo principal da glibenclamida são os canais de K^+ -ATP, que desempe-

nam uma função importante no controle do potencial de membrana da célula beta (ASHCROFT e RORSMAN, 1989).

O mecanismo de ação da glibenclamida se inicia com o bloqueio dos canais de K^+ por uma ligação de alta afinidade com a subunidade SUR1. A glibenclamida também interage com Kir6.2, porém com uma ligação de baixa afinidade. O efeito terapêutico da glibenclamida para o tratamento do DM2 se deve à interação com a subunidade SUR1 (GRIBBLE, TUCKER e ASHCROFT, 1997; GRIBBLE et al., 1998; GRIBBLE e ASHCROFT, 1999; RUSS et al., 1999). Além disso, SUR1 e Kir6.2 presentes na membrana plasmática também estão nos grânulos contendo insulina que estão no citoplasma. A glibenclamida possui a capacidade de ligação aos canais de K^+ presente nos grânulos citoplasmáticos contendo insulina, sendo deste modo, atribuído um efeito adicional e um aumento da eficácia da glibenclamida em relação as outras sulfonilureias (GENG et al., 2003).

Por a glibenclamida ser um medicamento de destaque no tratamento do diabetes, houve um maior interesse por estudos relacionados com modificações na estrutura química fundamental dessa molécula. YURIEV, KONG e ISKANDER (2004), demonstraram através de predições teóricas, usando análise conformacional Monte Carlo (CoMFA) para glibenclamida, a importância de alguns elementos estruturais para o bloqueio dos K^+ -ATP. SCHNEIDER et al. (2007) propuseram a inserção de uma molécula de glicose como substituinte no anel A, composto pelo anel benzênico substituído com 2-metoxi,5-cloro para melhorar a solubilidade, porém a glibenclamida glicosilada não aumentou a afinidade por SUR-1 (constante de dissociação (K_d) 2,08 nM) comparado ao análogo não glicosilado (K_d 0,38 nM). ZHANG et al. (2009) propuseram novos análogos baseados na estrutura de duas sulfonamidas com ação antiplaquetária e nefroprotetora, formando híbridos com a estrutura original da glibenclamida, gerando promissores compostos hipoglicemiantes.

1.8 ACILHIDRAZONAS COMO ALVOS TERAPÊUTICOS ATRAENTES

A relação estrutura e atividade de uma numerosa série de N-acilhidrazonas com potente atividade antiinflamatória, antinociceptiva e antiplaquetária (FRAGA et al., 2000; FRAGA e BARREIRO et al., 2006) foram descritas. N-acilhidrazonas também possuem um efeito cardioionotrópico e vasodilatador da musculatura lisa vascular (SILVA

et al., 2005). Uma potente relação estrutura-atividade de 3,4,5-trimetoxihidrazonas foi descrita em função da atividade anticancerígena pela habilidade de provocar a despolimerização de tubulina (WANG et al., 2009); resultados estes, posteriormente patenteados (UFSC, 2011). A estrutura química das acilhidrazonas se assemelha às chalconas, compostos sintéticos conhecidos pela notável ação anti-hiperglicêmica (DAMAZIO et al., 2009; DAMAZIO et al., 2010). Contudo ainda não se investigou se as acilhidrazonas possuem efeitos metabólicos capazes de alterar a glicemia.

1.9 JUSTIFICATIVA

Atualmente, o tratamento de DM1 consiste na reposição de insulina, seja pela administração de insulina exógena ou de uma maneira que procure imitar a resposta secretória de células beta. Ainda existe a possibilidade do transplante do pâncreas ou aloenxertos de ilhotas isoladas. No entanto, a imunossupressão ao longo da vida, com todos os efeitos secundários associados, juntamente com a limitada disponibilidade de doadores de órgãos, limita qualquer abordagem baseada em transplante. Além disso, enquanto a administração de insulina exógena pode atrasar ou retardar o desenvolvimento de complicações do diabetes, este tratamento não pode impedir esta ocorrência (HANLEY et al., 2009).

Para o DM2, o tratamento que a indústria farmacêutica disponibiliza está dividido em duas grandes categorias: secretagogos de insulina - compostos que aumentam a resposta secretora de insulina nas células beta - e sensibilizadores de insulina - compostos que potencializam o efeito da insulina em tecidos-alvo. Enquanto estes medicamentos certamente são úteis no tratamento da doença, permanece o fato de que uma proporção significativa de pacientes com DM2 eventualmente exigem insulina exógena devido à perda progressiva da função das células beta e do aumento na resistência à insulina (HANLEY, 2009).

A partir destes dados o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade biológica e o mecanismo de ação dos compostos derivados de sulfonamidas baseados no fragmento da glibenclâmida e das acilhidrazonas sintéticas em modelos experimentais de diabetes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a atividade biológica de derivados de sulfonamidas e acilhidrazonas sintéticas, bem como, as vias de sinalização envolvidas na regulação da homeostasia da glicose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito antihiperglicêmico de derivados de sulfonamidas e acilhidrazonas sintéticas em ratos hiperglicêmicos e diabéticos;
- Estudar o efeito de derivados de sulfonamidas e acilhidrazonas sintéticas na secreção de insulina após o tratamento agudo em ratos hiperglicêmicos;
- Determinar o efeito de derivados de sulfonamidas e acilhidrazonas sintéticas no conteúdo de glicogênio muscular e hepático;
- Estudar o efeito da sulfonamida **5** e do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na atividade das dissacaridases intestinais em ratos hiperglicêmicos e *in vitro*;
- Estudar o efeito tóxico de derivados de sulfonamidas e acilhidrazonas sintéticas através dos níveis de LDH séricos após o tratamento agudo em ratos hiperglicêmicos;
- Estudar o efeito e o mecanismo de ação de derivados de sulfonamidas e acilhidrazonas sintéticas na captação de cálcio em ilhotas pancreáticas (efeito antihiperglicêmico);
- Estudar o efeito da sulfonamida **11** e do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na captação de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose em tecido adiposo e músculo sóleo de ratos normoglicêmicos, caracterizando o mecanismo de ação (efeito insulinomimético).
- Estudar o efeito da sulfonamida **11** para inibir produtos finais de glicação avançada.

3. METODOLOGIA

A metodologia utilizada nesta tese de doutorado está apresentada dentro dos capítulos.

4. EFEITOS ANTI-DIABÉTICOS DE DERIVADOS DA SULFONAMIDA BASEADOS EM UM FRAGMENTO ESTRUTURAL DAS SULFONILUREIAS

ARTIGO PUBLICADO

Periódico: Current Trends Medicinal Chemistry

FREDERICO MJS, MASCARELLO A, MENDES CP, KAPPEL VD,
CAZAROLLI LH, BUSS Z, STUMPF TR, YUNES RA; NUNES RJ;
SILVA FRMB.

Efeitos anti-diabéticos dos derivados da sulfonamida baseados em um fragmento estrutural das sulfonilureias

Marisa Jádna Silva Frederico¹; Alessandra Mascarello²; Camila Pires Mendes¹; Virgínia Demarchi Kappel¹; Luisa Helena Cazarolli³; Ziliane Buss⁴; Taisa Regina Stumpf²; Rosendo Augusto Yunes²; Ricardo José Nunes²; Fátima Regina Mena Barreto Silva¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

³Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Universitário Laranjeiras do Sul, Bairro Vila Alberti, CEP 85303-775, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil

⁴Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito antidiabético de 12 derivados da sulfonamida com base em um fragmento de glibenclamida usando a estratégia bioisosterismo. Os efeitos hipoglicemiantes de derivados da sulfonamida foram investigados na glicemia, na secreção de insulina, na captação de cálcio, no conteúdo de glicogênio, na atividade das dissacaridades intestinais e da lactato desidrogenase. A sulfonamida **5**, substituída com o grupo 4-OCH₃-fenilo, apresentou a melhor redução da glicemia na curva de tolerância oral à glicose e a melhor secreção de insulina, entre os compostos estudados. Além disso, estes derivados da sulfonamida estimulam o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas semelhante às sulfonilureias. O efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação de cálcio é mediado pelos canais de K⁺ dependentes de ATP, canais de cálcio do tipo L dependentes da voltagem, cálcio intracelular e pela proteína cinase C em células beta nas ilhotas pancreáticas. Alvos adicionais envolvidos na homeostase da glicose foram estudados na presença de sulfonamida **5**. No intestino, este composto inibiu a atividade da maltase e da sacarase e no músculo esquelético aumentou o conteúdo de glicogênio. A toxicidade de sulfonamida **5** não foi detectada pelo ensaio de LDH. Em conjunto, os dados apontam para alvos múltiplos em que a sulfonamida **5** é capaz de contribuir para a homeostase da glicose. O perfil farmacológico da sulfonamida **5** mostrou que este composto pode ser útil para o tratamento do diabetes, tanto como um secretago de insulina, como um agente insulinomimético.

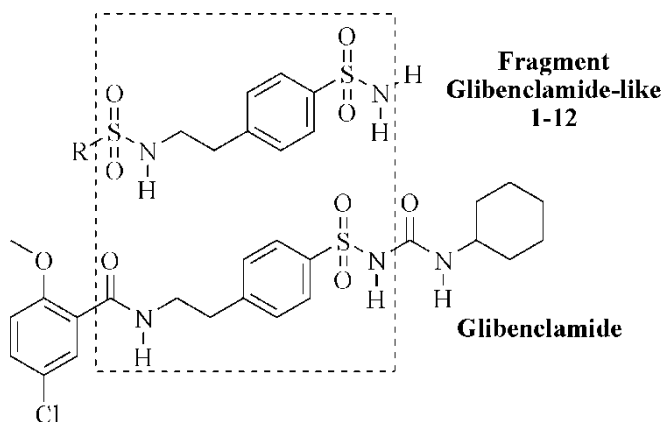
Palavras-Chave: Derivados da sulfonamida, síntese química, atividade hipoglicêmica, secreção de insulina, cálcio, ilhotas pancreáticas.

4.1 INTRODUÇÃO

A descoberta do efeito hipoglicemiante das sulfonamidas em 1942 marcou um período importante para o tratamento do DM2 (rev. em LOUBATIÈRES-MARIANI, 2007). Marcel Janbon e seus colegas perceberam que em alguns pacientes que foram administrados com p-amino-benzeno-sulfonamida-isopropiltiodiazol (2254RP) para o tratamento da febre tifóide experimentaram hipoglicemia grave (LOUBATIÈRES-MARIANI, 2007). Estas observações foram mais profundamente investigadas, e l-butil-3-sulfonil-(carbutamida) se tornou a primeira sulfoniluréia a ser clinicamente útil no tratamento do diabetes (KLEINSORGE, 1998; HENQUIN, 2004; LOUBATIÈRES-MARIANI, 2007). O mecanismo descrito para a ação hipoglicêmica de todas as sulfonilureias, incluindo o composto mãe 2254RP, envolve as seguintes etapas: o bloqueio de canais de K^+ dependentes de ATP (K^+ -ATP), uma diminuição na permeabilidade da membrana de plasmática das células beta ao K^+ ; despolarização que ativa canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem e aumento da captação de Ca^{2+} , o que provoca um aumento de Ca^{2+} citoplasmático livre, desencadeamento a exocitose de grânulos de insulina pré-formados (HENQUIN, 2004). A glibenclamida (gliburida) é uma potente sulfoniluréia de segunda geração, que melhora a homeostase da glicose, agindo na secreção e na ação da insulina (LUZI e POZZA 1997). Alguns estudos relacionados com a modificação estrutural de glibenclamida resultaram na inserção de uma molécula de glicose na estrutura de base original, para melhorar a solubilidade deste grupo (SCHNEIDER et al., 2007). Outro estudo demonstrou, por meio de prospecção teórica da análise comparativa dos campos moleculares de glibenclamida, a importância dos elementos estruturais no bloqueio de K^+ -ATP (YURIEV, KONG e ISKANDER, 2004). ZHANG et al. (2009) propuseram novos análogos com base na estrutura de glimepirida com ação antiplaquetária e nefroprotetora, formando híbridos com a estrutura original de glibenclamida, gerando promissores compostos hipoglicêmicos. Apesar de inúmeros esforços para obter um fármaco eficiente e potente para melhorar a qualidade de vida de pacientes diabéticos, a glibenclamida ainda é um dos fármacos disponíveis úteis para controlar os níveis de glicose. Os efeitos secundários da glibenclamida no tratamento do diabetes crônico estão concentrados na exaustão da célula beta para a secreção de insulina (RABUAZZO et al., 1992; BALL, FLATT e

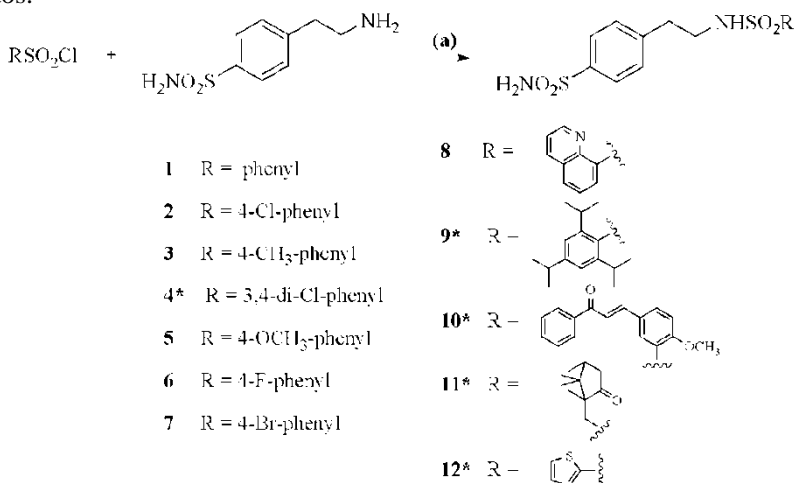
MCCLLENAGHAN, 2000; BALL et al., 2000). Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi sintetizar derivados da sulfonamida a partir de um fragmento estrutural de glibenclamida (Esquema 4.1), com a substituição do grupo carbonila pelo grupo sulfonila utilizando a técnica de bioisosterismo não clássico. A atividade biológica foi avaliada na glicemia e na secreção de insulina *in vivo*, e os mecanismos de ação *in vitro*, que são ainda desconhecidas, foram investigados.

Esquema 4.1. Estratégia da síntese de derivados da sulfonamida.



Nossa primeira estratégia sintética foi obter sulfonamidas com os substituintes do topo do esquema de Topliss (TOPLISS, 1972): H, p-Cl, p-CH₃, m,p-Cl₂ e p-OCH₃ (1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente), e também outros compostos p-substituídos com grupos retiradores de elétrons, F e Br (6 e 7, respectivamente). A segunda estratégia considerou substituintes mais complexos (8-12), como mostrado no Esquema 4.2.

Esquema 4.2. Síntese das sulfonamidas. (a) Piridina. * compostos inéditos.



As sulfonamidas 1-12 (Esquema 4.2) foram preparadas a partir da reação entre a 4-(2-aminoetil)benzenossulfonamida em piridina por 16h, à temperatura ambiente. Os compostos foram obtidos com rendimentos variáveis entre 61 e 89%. As estruturas dos compostos **4**, **9**, **10**, **11** e **12** são inéditas e foram caracterizadas por ressonância magnética nuclear de espectroscopia (RMN) de ^1H e de ^{13}C , espectros de infravermelho (IV) e espectrometria de massa (EM).

4.2 QUÍMICA

4.2.1 Dados físico-químicos dos compostos sintetizados

As estruturas foram confirmadas pelos pontos de fusão (p.f.), ^1H e ^{13}C por meio da RMN e da massa de dados espectrais. Os pontos de fusão foram determinados com um aparelho MGAPF-301 Microquímica. Os espectros de IV foram determinados com um espectrometro F-TLA Bomen Abb 2000 em discos de KBr. Os espectros de RMN (^1H e ^{13}C) foram registados com um Varian Oxford AS-400 (400 MHz) do instrumento; dimetil sulfóxido- d_6 (DMSO- d_6) foi utilizado como solvente e tetrametilsilano como padrão interno. Os dados espectrais de massa foram obtidos a partir do instrumento eletrospray/ion ESQUIRE Bruker em modos de íons positivos e negativos.

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Materiais

O aloxano mono-hidratado, a glibenclamida, a diazoxida, a nifedipina, o 1,2-bis (2-aminof enoxi) etano-N, N, N', N'-tetraquis-tetra-acético (éster acetoximetil) (BAPTA-AM) e o 2 - {1 - [3 - (amidinotio)-propil]-1H-indol-3-il} -3 - (1-metil-indol-3-il) maleimida sal metanos-sulfonato RO 31-8220 foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA). Sais e solventes foram adquiridos da Merck ® AG (Darmstadt, Alemanha). Coquetel de cintilação biodegradável líquido Optiphas Hisafe III foi adquirido da Perkin Elmer (Boston, EUA).

A glibenclamida e a sulfonamida **12**, nos experimentos *in vivo*, foram dissolvidas em uma solução de 0,3% de Tween 80. Em todos os experimentos, o veículo (solução a 0,3% de Tween 80 ou água destilada) não alterou os resultados, em qualquer condição experimental, para grupos basais e tratados (dados não mostrados). Derivados da sulfonamida **1-11** foram dissolvidos em água destilada. Nos experimentos *in vitro*, a glibenclamida e os compostos **1, 3, 5, 7 e 9** foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO), que foi adicionado no grupo controle em concentrações finais não superiores a 0,1% (v/v). A esta concentração, DMSO não afeta a função das ilhotas pancreáticas (LEBRUN et al., 1996).

4.3.2 Síntese dos derivados da sulfonamida

4.3.2.1 Procedimento geral para a preparação de sulfonamidas

As sulfonamidas foram preparadas por meio da reação entre [4 - (2-aminoetil)-benzenossulfonamida] (1,0 mmol) e o cloreto de sulfonyl apropriado (1,0 mmol), em piridina seca (20 mL). A mistura resultante foi agitada por 16 h. Foi adicionado gelo à mistura reacional e esta foi acidificada com solução de ácido clorídrico. O sedimento foi então obtido por filtração de vácuo e recristalizado a partir de etanol (metodologia

adaptada de YURIEV, KONG e ISKANDER (2004). A pureza dos compostos sintetizados foram analisados por cromatografia em camada fina (TLC) usando placas de sílica Merck pré-revestidas de alumínio de 200 µm de espessura, com sistemas de solventes de diferentes polaridades. As sulfonamidas são solúveis em DMSO e acetona. Todos os solventes e reagentes utilizados foram adquiridos a partir de Merck, Sigma-Aldrich, Fluka e Vetec, exceto o cloreto de chalcona (reagente utilizado para a síntese do composto **10**), que foi sintetizado tal como descrito por ANDRIGHETTI-FROHNER et al. (2009). As sulfonamidas **4**, **9**, **10**, **11** e **12** são estruturas novas com efeitos desconhecidos. Os outros compostos foram previamente sintetizados: **1**, **2**, **3** e **7** (ZHANG et al., 2009), **8** (BORRAS et al., 1999), **5** e **6** (JALALI-HERAVI e KYANI, 2007).

4 - 3,4-dicloro-*N*-(4-sulfamoiiphenetil)benzenosulfonamida. Sólido, amarelo claro, p.f. 161-162°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.76 (t, NH-CH₂-CH₂); 3.03 (q, NH-CH₂-CH₂); 7.28 (s, NH₂); 7.35 (d, $J=8.0\text{Hz}$, H2, H6); 7.70 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H, H6'); 7.71 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H, H3, H5); 7.86 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H, H5'); 7.94 (s, 1H, H2'); 7.95 (t, $J=8\text{Hz}$, 1H, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 35.38 (NH-CH₂-CH₂); 43.88(NH-CH₂-CH₂); 126.09 (C2, C6); 127.09 (C6'); 128.74 (C2'); 129.69 (C3, C5); 132.13 (C5'); 132.57 (C3'); 135.93 (C4'); 141.12 (C1'); 142.67 (C4); 143.18 (C1). MS (ESI) m/z 431.0 (M + Na)⁺. Produziu = 85%.

9 - 2,4,6-triisopropil-*N*-(4-sulfamoiiphenetil)benzenosulfonamida. Sólido, amarelo, p.f. 198-199°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.17 (d, 12H, $J=8.0\text{Hz}$, CH₃); 1.21 (d, 6H, $J=8.0\text{Hz}$, CH₃); 2.79 (t, NH-CH₂-CH₂); 2.95-2.88 (m, 1H, CH); 3.07 (q, NH-CH₂-CH₂); 4.16-4.09 (m, 2H, CH); 7.23 (s, NH₂); 7.32 (m, 4H, H2, H6, H3', H5'); 7.67 (t, 1H, NH); 7.71 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 24.13 (2C, CH₃); 25.42 (4C, CH₃); 29.46 (2C, CH); 33.99 (1C, CH); 35.73 (NH-CH₂-CH₂); 43.43(NH-CH₂-CH₂); 124.21 (C3', C5'); 126.34 (C2, C6); 129.74 (C3, C5); 133.87 (C1'); 142.86 (C4); 143.62 (C1); 150.32 (C2', C6'); 152.69 (C4'). MS (ESI) m/z 489.2 (M + Na)⁺. Produziu = 62%.

10 - (*E*)-2-metoxi-5-(3-oxo-3-phenilprop-1-enil)-*N*-(4-sulfamoiiphenetil) benzenosulfonamida. Sólido branco, p.f. 194-196°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.75 (NH-CH₂-CH₂, t); 3.08 (NH-CH₂-CH₂, q); 3.89 (s, 3H, CH₃); 7.27 (NH₂, s); 7.30 (d, $J=8.0\text{Hz}$, H2, H6); 7.25 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H, H5'); 7.43 (t, 1H, H4''); 7.56 (m, 3H, H3'', H5'', H2''); 7.65 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H, H4''); 7.67 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H, H3, H5); 7.74 (d, $J=16.0\text{Hz}$,

1H, H α); 7.86 (d, $J=16.0\text{Hz}$, 1H, H β); 8.13-8.15 (m, 3H, H2'', H6'', NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 35.33 (NH-CH $_2$ -CH $_2$); 43.91 (NH-CH $_2$ -CH $_2$); 56.92 (OCH $_3$); 113.83 (C5'); 121.68 (C1'); 126.02 (C2, C6); 127.31 (C α); 128.81 (C2'); 128.99 (C3, C5); 129.23 (C2'', C6''); 129.56 (C3'', C5''); 130.35 (C3'); 133.56 (C4'); 135.26 (C4''); 138.04 (C1''); 142.51 (C4); 143.14 (C1); 143.40 (C β); 158.26 (C6'); 189.48 (C=O). MS (ESI) m/z 523.1 (M + Na) $^+$. Produziu = 89%.

11 - 4-(2-((7,7-dimetil-2-oxobiciclo[2.2.1]heptan-1-il)methylsulfonamida) etil)benzenosulfonamida. Sólido branco, p.f. 164-165°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 0.76 (CH $_3$); 0.97 (CH $_3$); 1.34, 1.48, 1.86, 1.90, 2.01, 2.28, 2.33 (7m, 7H, canforilo); 2.83 (t, 2H, NH-CH $_2$ -CH $_2$); 2.87, 3.28 (2m, 2H, CH $_2$ SO $_2$); 3.24 (NH-CH $_2$ -CH $_2$, q); 7.12 (1H, NH); 7.27 (NH $_2$, s); 7.42 (d, $J=8.0\text{Hz}$, H2, H6); 7.73 (d, $J=8\text{Hz}$, 2H, H3, H5). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 19.75 (2C, CH $_3$); 24.86 (C3'); 26.71 (C2'); 35.94 (NH-CH $_2$ -CH $_2$); 42.42 (C4', C5'); 44.11 (NH-CH $_2$ -CH $_2$); 47.95 (C7'); 58.23 (C1', -CH $_2$ SO $_2$); 126.11 (C3, C5); 129.72 (C2, C6); 142.62 (C4); 143.60 (C1); 215.10 (C=O). IR $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3397 (NH $_2$); 3233 (NH); 1348 (SO $_2^{\text{as}}$); 11572 (SO $_2^{\text{sym}}$); 1094; 904; 8657; 736 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 437.1 (M + Na) $^+$. Produziu = 61%.

12 - N-(4-sulfamoiilphenetil)tiophene-2-sulfonamida. Sólido, amarelo claro, p.f. 136-137°C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 2.77 (t, NH-CH $_2$ -CH $_2$); 3.06 (q, NH-CH $_2$ -CH $_2$); 7.16 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H, H4'); 7.29 (s, NH $_2$); 7.35 (d, $J=8.0\text{Hz}$, H2, H6); 7.55 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H, H3'); 7.71 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H, H3, H5); 7.90 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H, H2'); 7.92 (t, NH). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 40.14 (NH-CH $_2$ -CH $_2$); 49.21 (NH-CH $_2$ -CH $_2$); 131.10 (C2, C6); 133.16 (C3'); 134.63 (C3, C5); 137.90 (C5'); 146.55 (C4'); 147.61 (C4); 148.32 (C1). IR $\lambda_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3361 (NH $_2$); 3269 (NH); 1347 (SO $_2^{\text{as}}$); 1162 (SO $_2^{\text{sym}}$); 1018; 934; 817; 737 (Ar) (KBr). MS (ESI) m/z 368.9 (M + Na) $^+$. Produziu = 75%.

4.3.3 Animais experimentais

Ratos *Wistar* albinos (180-210 g; 48-50 dias de idade) foram criados em um biotério setorial com ar condicionado (aproximadamente 21 ± 2 °C) e iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os ratos foram mantidos com ração peletizada (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil) e água de torneira ad libitum. Para tratamentos *in vivo* os

ratos foram privados de alimentos durante pelo menos 16 h, mas com o acesso livre à água. Todos os animais foram monitorados e mantidos de acordo com a lei Lei Arouca n.º 11.794/08 seguindo as recomendações éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA protocolo PP00414/UFSC).

4.3.4 Estudo do efeito dos derivados da sulfonamida na curva de tolerância oral à glicose

Ratos hiperglicêmicos foram divididos em diferentes grupos de quatro animais (veja em Tabelas e Figuras), em controle e tratados. Grupos controle foram aleatoriamente divididos da seguinte forma: ratos que receberam veículo (solução de 0,3% de Tween 80) e ratos que receberam glicose (4 g/kg; 8,9 M), via oral por gavagem. Os ratos tratados, além da sobrecarga de glicose, receberam sulfonamidas **1-12** (10 mg/kg) ou glibenclamida (1, 10 e 100 mg/kg) via oral por gavagem. Os níveis de glicose no soro foram medidos imediatamente antes, e aos 15, 30, 60 e 180 min após a sobrecarga de glicose. Após a centrifugação, as amostras de soro foram utilizadas para determinar os níveis de glicose, insulina e ou atividade da lactato desidrogenase. A glicemia foi determinada pelo método da glicose oxidase (VARLEY, GOWENLOCK e BELL, 1976).

4.3.5 Efeito da sulfonamida 5 na glicemia em ratos diabéticos

O diabetes foi induzida por uma única injeção intravenosa de 5% de mono-hidrato de aloxano em solução salina, em uma dose de 50 mg/kg de peso corporal. Amostras de sangue foram coletadas 3 dias após e os níveis de glicose foram determinadas para confirmar o desenvolvimento do diabetes (DAMAZIO et al., 2010). Ratos diabéticos em jejum receberam a sulfonamida **5** (10 mg/kg) por gavagem via oral. A glicose foi medida no soro antes e depois de 1, 2 e 3 h de tratamento.

4.3.6 Ensaio de insulina sérica

A detecção da insulina foi pela aplicação do ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) – para ratos e camundongos (Millipore, Research Park Drive, Missouri, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O intervalo de valores detectados pelo presente ensaio foi de 0,63 ng/mL a 4,3 ng/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra-e inter-ensaio para insulina foram 3,22 e 6,95; respectivamente, com uma sensibilidade de 0,2 ng/mL. Todos os níveis de insulina foram estimados por meio de medições colorimétricas a 450 nm com um leitor de placas de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, EUA), por interpolação a partir de uma curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como ng de insulina no soro mL⁻¹. As áreas incrementais nas curvas de resposta (AUC) foram calculadas. O índice insulinogênico (II) foi calculado como a razão entre o AUC insulina e AUCglicose (de zero a 60 min) e está expresso em (ng de insulina sérica/mg de glicose sérica) (DAMAZIO et al., 2010).

4.3.7 Isolamento de ilhotas pancreáticas

O pâncreas do rato foi visualizado por meio de uma incisão central abdominal. O ducto biliar foi fixado na ponta do duodeno e canulado em um ponto suficientemente próximo ao fígado. O tampão Krebs Ringer bicarbonato (122 mM de NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM de MgSO₄, 1,3 mM CaCl₂, 0,4 mM KH₂PO₄ 25 mM, NaHCO₃) foi suplementado com 8 mM de HEPES (KRb-HEPES) e o meio foi introduzido lentamente no ducto biliar por meio de seringa até o pâncreas se tornar claramente distendido. O pâncreas então foi removido cuidadosamente, mantido em uma placa de Petri com meio de KRb-HEPES. O tecido pancreático foi fatiado em pedaços pequenos (2 x 2 mm) e incubado em tubos de plástico em 1 mL de meio KRb-HEPES suplementado com collagenase (3 mg). Após a incubação, a mistura foi transferida para um tubo conico e ressuspensionado em 10 mL de meio KRb-HEPES isento de collagenase. Este foi centrifugado à temperatura ambiente durante 3 min a 45 x g em uma centrífuga Excelsa Baby (modelo 206), FANEM, São Paulo, SP, Brasil. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspensionado em meio de KRb-HEPES. Este procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes, nas duas últimas lavagens as ilhotas foram deixadas decantar, sem centrifugação. Alíquotas (100 µL) do sedimento final com as ilhotas isoladas foram transferidas para tubos de Eppendorff com o meio

de incubação KRb-HEPES (LACY e KOSTIANOVSKY, 1967; GRILLO et al., 2005).

4.3.8 Experimentos com captação de cálcio

As ilhotas isoladas foram pré-incubados durante 60 min em um incubador metabólico Dubnoff para equilibrar a quantidade de cálcio intra e extracelular no tampão KRb- HEPES contendo 5 mM de glicose, 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a 37°C, pH 7,4 e atmosfera gaseificada com O₂: CO₂ (95:5, v/v). As ilhotas foram incubadas em KRb-HEPES, sem (controle) ou com a acilhidrazona **1** (0,2; 2 e 20 μM). Em alguns experimentos os antagonistas ou agonistas de canais ou inibidores foram adicionados aos 45 min de incubação, correspondendo a 15 min antes do tratamento e mantidos durante todo o período de incubação (ver legendas das figuras). Os fármacos utilizados foram nifedipina (0,1; 1 e 10 μM), diazoxida (250 μM) (ZANATTA et al., 2011), BAPTA-AM (50 μM) e RO 31-8240 (50 μM) (ZANATTA et al., 2011). O tempo de incubação com o tratamento foi de 10 min. A incubação foi interrompida utilizando a técnica descrita por BATRA e SJOGREN, (1983), com modificações (ZANATTA et al., 2011). Tampão frio (1 mL com cloreto de lantânio (10 mM) a 2°C foi adicionado às amostras para bloquear o fluxo de cálcio. Os tubos foram centrifugados durante 1 min a 45 x g. O sobrenadante foi conservado e as ilhotas foram lavadas duas vezes em solução de cloreto de lantânio fria. As ilhotas foram adicionadas a tubos de eppendorfs contendo 300 μL de solução de NaOH 0,5 M e fervidas a 100 °C durante 5 min. Alíquotas de 50 μL foram retiradas de cada amostra para a medição da radioatividade no líquido de cintilação Opti-phase Hisafe III (Wallac Oy, Turku, Finlândia) em um espectrômetro de cintilação líquida rack LKB beta (modelo LS 6500; multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, EUA), e alíquotas de 5 μL foram utilizadas para a quantificação de proteína pelo método de LOWRY et al., (1951).

4.3.9 Extração e ensaio das dissacarídeos

Os ratos hiperglicêmicos foram divididos em 2 grupos de 4 animais: controle hiperglicêmicos e grupos tratados. Ratos controle hiperglicêmico receberam glicose (4 g/kg; 8,9 M) por gavagem. Ratos trata-

dos receberam sulfonamida **5** por gavagem 30 min antes da sobrecarga de glicose. Três horas após, um segmento do intestino delgado foi removido, lavado em solução de NaCl a 0,9%, secado sobre papel de filtro, pesado, cortado e homogeneizado (300 rpm) em NaCl a 0,9% (400 mg de duodeno por mL). O homogeneizado resultante foi centrifugado a 8000 rpm durante 8 min. O sobrenadante foi utilizado para a medição da atividade da maltase e da sacarase e para a determinação de proteína (PEREIRA et al., 2011).

Atividades da maltase (EC 3.2.1.20) e da sacarase (EC 3.2.1.48) foram determinadas utilizando um kit de diagnóstico de glicose baseado no reagente de glicose oxidase. Os homogeneizados do duodeno foram então incubados a 37 °C durante 5 min com o substrato. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisou a liberação de 1 μ mol de glicose por min nas condições de ensaio. A atividade específica foi definida como a atividade da enzima (U) por mg de proteína (DAHLQVIST, 1984). A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY et al., (1951). Os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos, juntamente com os controles apropriados.

4.3.10 Medidas de glicogênio muscular e hepático

Músculo sóleo e fígado foram removidos de ratos hiperglicêmicos, tratados e não tratados com as sulfonamidas **1**, **3**, **5**, **7**, **9** ou glibenclamida (10 mg/kg), e em seguida utilizados para o ensaio de conteúdo de glicogênio 3 h após a sobrecarga de glicose. Os tecidos foram pesados, homogeneizados em KOH 33% e fervido a 100 °C durante 20 min, com agitação ocasional. Após o arrefecimento, etanol a 96% foi adicionado às amostras que foram aquecidas até a fervura seguida de um arrefecimento em banho de gelo para auxiliar a precipitação do glicogênio. Os homogeneizados foram centrifugados a 1300 x g durante 15 min o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi neutralizado com NH₄Cl saturado. Estes foram aquecidos a 100 °C durante 5 min, lavados e ressolubilizados em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado por meio de tratamento com o reagente de iodo e a absorbância foi medida a 460 nm (KRISMAN, 1962). Os resultados são expressos como mg de glicogênio/g de tecido.

4.3.11 Ensaio da lactato desidrogenase

A toxicidade *in vivo* foi avaliada por medição da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase (LDH) no soro depois de 3h e 30 min de tratamento com as sulfonamidas **1**, **3**, **5**, **7**, **9** ou glibenclamida ou no meio de incubação em ilhotas pancreáticas isoladas com 10 min de tratamento da sulfonamida **5** ou da glibenclamida. A atividade da LDH foi medida por espectrofotômetro e o nível de atividade foi calculado pela medição da oxidação do NADH. Os resultados foram expressos em % do controle (ZANATTA et al., 2011).

4.3.12 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a Média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificado nas figuras. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Efeito de derivados da sulfonamida na glicemia

Na Tabela 4.1, o efeito de derivados da sulfonamida nos níveis de glicose séricos em ratos hiperglicêmicos foi examinado. Inicialmente, uma curva de dose-resposta de um controle positivo, a glibenclamida (1, 10 e 100 mg/kg), na curva de tolerância à glicose oral foi obtida. O grupo controle hiperglicêmico, após a sobrecarga de glicose, obteve uma curva de aumento na glicemia quando comparado com o tempo zero do mesmo grupo. Glibenclamida reduziu a glicemia após 15, 30 e 60 min, nas doses de 10 mg/kg (23%, 32% e 30%) e 100 mg/kg (14%, 31% e 22%), em comparação com o grupo controle hiperglicêmico, respectivamente. Por outro lado, não foi observada alteração na glicemia após tratamento com glibenclamida 1 mg/kg. Com base nestes resultados, a dose de 10 mg/kg foi utilizada em estudos posteriores, com derivados da

sulfonamida. A eficiência da glibenclamida 10 mg/kg para redução da glicemia está de acordo com os dados na glicemia e secreção de insulina em ratos (SAKAMOTO et al., 2006; LEÓN-REYES, CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ e ORTIZ, 2009).

Tabela 4.1: Efeito dos derivados da sulfonamida (10 mg/kg) e glibenclamida (10,1 e 100 mg/kg) na glicemia de ratos *Wistar* em jejum. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^a $p \leq 0,05$; ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico.

Grupo		Níveis de glicose séricos (mg/dL) Tempo (min)				
		0	15	30	60	180
Hiperglicêmico		102,29 \pm 6,34	177,46 \pm 5,95	190,15 \pm 1,77	182,55 \pm 6,95	141,15 \pm 4,47
Glibenclamida	10	112,06 \pm 5,61	140,49 \pm 11,13	135,24 \pm 5,67	128,34 \pm 5,44	124,28 \pm 3,87
	1	105,26 \pm 1,42	178,53 \pm 2,55	171,20 \pm 1,42	170,82 \pm 1,91	146,24 \pm 1,93
	100	98,77 \pm 1,51	145,90 \pm 2,60 ^c	140,43 \pm 2,54 ^c	141,90 \pm 2,45 ^c	131,27 \pm 1,14
Sulfonamida	1	114,70 \pm 0,68	135,96 \pm 4,02 ^c	158,70 \pm 2,62 ^c	155,00 \pm 4,60 ^b	142,39 \pm 4,68
	2	97,41 \pm 1,92	137,40 \pm 3,61 ^c	166,82 \pm 4,49 ^c	177,19 \pm 5,72	124,00 \pm 2,67
	3	112,69 \pm 1,51	147,18 \pm 2,69 ^c	157,22 \pm 4,89 ^c	138,40 \pm 2,89 ^c	131,61 \pm 8,33
	4	110,01 \pm 2,053	146,59 \pm 0,95 ^c	148,20 \pm 2,52 ^c	152,17 \pm 4,20 ^a	143,28 \pm 3,05
	5	100,66 \pm 2,30	131,03 \pm 4,04 ^c	145,04 \pm 5,00 ^c	140,05 \pm 4,30 ^c	135,72 \pm 4,39
	6	107,65 \pm 2,71	174,07 \pm 5,78	166,42 \pm 12,43 ^b	185,92 \pm 4,99	125,15 \pm 3,14 ^b
	7	101,39 \pm 1,84	139,98 \pm 10,24 ^c	153,59 \pm 9,61 ^c	158,48 \pm 9,06	147,04 \pm 4,37
	8	115,92 \pm 2,80	163,92 \pm 0,24 ^c	164,79 \pm 6,80	160,27 \pm 4,00	142,10 \pm 1,86
	9	115,69 \pm 1,42	133,59 \pm 2,31 ^c	144,34 \pm 8,93 ^c	158,91 \pm 6,13 ^c	129,64 \pm 7,04
	10	120,93 \pm 6,68	143,33 \pm 8,36 ^c	130,93 \pm 3,94 ^c	139,33 \pm 6,13 ^c	140,00 \pm 4,23
	11	104,53 \pm 3,39	131,85 \pm 7,87 ^c	133,64 \pm 4,74 ^c	127,10 \pm 2,95 ^c	128,16 \pm 4,68
	12	105,46 \pm 3,95	144,96 \pm 3,41 ^c	153,12 \pm 6,88 ^c	157,99 \pm 6,88	131,63 \pm 2,86
Aloxano + Sulfo- namida 5		324,85 \pm 8,34	-	-	325,38 \pm 11,96	441,49 \pm 18,84

Como pode ser observado na Tabela 4.1, a administração oral da sulfonamida **1** reduziu a glicemia em 24, 16 e 14%, após 15, 30 e 60 min, respectivamente. No entanto, a presença de um p-cloreto no anel fenilo de sulfonamida **2** levou a uma redução da glicemia (cerca de 23% após 15 min), embora este composto tenha sido menos potente que o composto **1**. Com a presença de 3,4-Cl₂-fenil sulfonamida no composto **4**, a redução da glicemia não foi significativamente diferente do observado para sulfonamidas **1** e **2**, anteriormente analisada.

A fim de comparar o composto **2** com outros grupos aceptores de elétrons, analisamos as sulfonamidas **6** e **7** (p-fluór e p-bromo no anel de fenilo, respectivamente). Sulfonamida **6** e **7** mostraram atividade biológica ligeira apenas em 30 min. Tomados em conjunto, estes resultados indicam que o p-fluór ou p-bromo não possuem um efeito significativo na atividade hipoglicemiante como substituintes.

Levando em conta esta constatação, testamos o efeito da sulfonamida **3** com p-CH₃ no anel fenilo. Como pode ser observado na Tabela 4.1, o efeito agudo do composto **3** proporcionou uma curva de tolerância à glicose semelhante ao observado para a glibenclamida. Este composto diminuiu a glicemia aproximadamente 24% a 60 min. Além disso, o tratamento com sulfonamida **5** (4-OCH₃-fenil) diminuiu a glicemia em 26%, 24% e 23%, após 15, 30 e 60 min, respectivamente. A fim de aumentar o número de grupos alquila, foi analisado o composto **9**, que contém um grupo 2,4,6-tri-isopropilo. Esta nova estrutura diminuiu significativamente a glicemia aproximadamente 24%, 24% e 13% após 15 min, 30 e 60 min, respectivamente. Deste modo, este composto está entre os que possuem melhor atividade anti-hiperglicêmica, como indicado na Tabela 4.1. Com base nestes resultados, se sugere que a presença de um grupo doador de elétrons seja importante para a atividade hipoglicemiante.

Outra sulfonamida nova, a **10**, foi sintetizada utilizando uma chalcona como um substituinte. Estudos anteriores relataram a importância de chalconas em relação à atividade anti-hiperglicêmica (ALBERTON et al., 2008; DAMAZIO et al., 2009), e, portanto, neste trabalho decidiu-se incorporar este fragmento a sulfonamida. Os resultados revelaram que o composto **10** também diminuiu a glicemia significativamente em comparação com o grupo controle.

A presença do grupo quinolínicico como um substituinte no composto **8** apresentou uma redução máxima da glicemia em torno de 14% em comparação com o grupo de controle. Outras duas novas sulfonamidas, **11** e **12** (substituídas com os grupos de tiofenila e canforila, respec-

tivamente) exibiram um efeito antihiper-glicêmico notável em relação ao controle hiper-glicêmico.

Em resumo, os substituintes aceptores de elétrons inseridos no fragmento de glibenclamida parecem não apresentar uma atividade hipoglicemiante relevante (2, 6, 7). No entanto, o grupo doador de elétrons aumenta a atividade (3, 5, 9) e, portanto, apresenta o efeito melhor na curva de tolerância oral à glicose.

O aloxano provoca uma destruição das células beta, por isso se torna uma abordagem útil para testar compostos com um efeito antihiper-glicêmico potencial (FEDERIUK et al., 2004). Os resultados apresentados na Tabela 4.1 mostram que sulfonamida 5 (4-OCH₃-fenilo), produz efeitos anti-diabéticos por meio de um mecanismo, provavelmente, que envolveu a secreção de insulina a partir de células beta. Desse modo, o próximo passo do estudo foi avaliar a capacidade das sulfonamidas de estimular a secreção de insulina.

4.4.2 Efeito de derivados da sulfonamida na secreção de insulina

As sulfonilureias são os principais medicamentos utilizados para o aumento da secreção de insulina no tratamento de DM2. Uma característica comum a todas as sulfonilureias e a sulfonamida 2254RP é que ambas agem nos canais de K⁺-ATP em células beta para secretar insulina (HENQUIN, 2004). De modo a analisar o perfil do secretagogo de derivados da sulfonamida três compostos ativos (3, 5, 9) e dois com menor atividade hipoglicêmica (1 a 7), foram selecionados de acordo com a Tabela 4.1.

Na Tabela 4.2, o derivado de sulfonamida 3 possui o efeito mais potente na secreção de insulina, apresentando um valor de índice insulínogênico (II) em torno de 2,5 vezes maior do que grupo controle hiper-glicêmico, seguido pelas sulfonamidas 1 e 5 que apresentaram valores do II por volta de 1,5 vezes maior que o grupo controle. Além disso, o efeito da sulfonamida 5 parece ser de longa duração, pois este composto foi mais eficaz em 60 min, em comparação com os outros.

Tabela 4.2: Efeito dos derivados da sulfonamida (10 mg/kg) nos níveis de insulina séricos em ratos *Wistar* em jejum. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^a $p \leq 0,05$; ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico. *Índice insulinogênico (ng/mg).

Grupo	Níveis de insulina séricos (ng/mL) Tempo (min)					II*
	0	15	30	60		
Hiperglicêmico	0,09 \pm 0,001	2,84 \pm 0,002	0,75 \pm 0,007	0,59 \pm 0,004		0,66
Glibenclamida	-	3,83 \pm 0,430a	2,66 \pm 0,001b	2,46 \pm 0,070c		1,98
1	-	3,89 \pm 0,007c	0,54 \pm 0,075	1,46 \pm 0,006c		1,02
3	-	6,03 \pm 0,002c	1,48 \pm 0,412c	1,44 \pm 0,009c		1,68
5	-	1,20 \pm 0,014	1,50 \pm 0,064c	1,83 \pm 0,009c		0,99
7	-	0,80 \pm 0,191	0,88 \pm 0,05	0,73 \pm 0,014a		0,50
9	-	0,21 \pm 0,056	0,40 \pm 0,010	0,87 \pm 0,154a		0,30

O grupo controle positivo, que recebeu a glibenclamida, foi eficaz, em induzir a secreção de insulina no período estudado; apresentando um II em torno de 2,0 (ng/mg). Vale a pena notar que a sulfonamida **3** foi capaz de induzir a secreção de insulina mais potente do que a glibenclamida dentro de um curto período (15 min). Notavelmente, a sulfonamida **5** (4, OCH₃-fenil) exibiu um perfil interessante de secreção de insulina, uma vez que ao longo do período de estudo da liberação de insulina permaneceu quase inalterada. Isto significa que, além de regular os níveis de glicose no soro, estes compostos podem preservar a fisiologia da célula beta. Embora, a glibenclamida seja um dos fármacos mais eficazes em termos de controle da glicose, a hiperplasia das células beta causada pelo tratamento crônico desta sulfoniluréia é um efeito secundário que tem de ser superado com novos fármacos (RABUAZZO et al., 1992; BALL et al., 2000; BALL et al., 2000).

4.4.3 Efeito de derivados de sulfonamida na captação de ⁴⁵Ca²⁺ em ilhotas pancreáticas

A fim de entender o mecanismo de ação destes compostos na secreção de insulina, os compostos **1**, **3**, **5**, **7**, **9** e a glibenclamida foram investigados na captação de cálcio *in vitro* em ilhotas pancreáticas (Tabela 4.3). Primeiramente, o efeito das sulfonamidas e da glibenclamida na captação de cálcio foi investigado em diferentes doses. A Tabela 4.3 mostra que o efeito estimulatório da glibenclamida na captação de ⁴⁵Ca²⁺, nas doses de 2 e 20 µM foi de cerca de 56 e 106% maior em comparação com o grupo de controle, respectivamente. Por outro lado, a dose de 0,2 µM da glibenclamida, assim como dos derivados da sulfonamida não foram encontradas diferenças significativas após 10 min de incubação (dados não apresentados). O efeito estimulatório dos derivados de sulfonamida na dose de 2 µM foi observado, para os compostos **5**, **7** e **9**. Além disso, o efeito estimulatório rápido da sulfonamida **5** (20 µM) na captação de cálcio foi 1,8 vezes maior que a glibenclamida. O efeito estimulatório da glibenclamida na captação de cálcio nas células beta e na secreção de insulina é semelhante ao efeito de um derivado de ácido benzóico que se assemelha a porção não-sulfonilureia da glibenclamida (GARRINO et al., 1985). Tendo em conta os resultados obtidos, a sulfonamida **5** apresentou redução na curva de tolerância à glicose, secreção de insulina e influência significativa na captação de cálcio.

Por isto, este composto foi selecionado para um estudo no mecanismo de ação do cálcio em ilhotas pancreáticas.

Tabela 4.3: Efeito dos derivados da sulfonamida na captação de cálcio em ilhotas pancreáticas.

Grupo	⁴⁵ Ca ²⁺ captação (% do controle)	
	2 µM	20 µM
Glibenclamida	134,79 ± 7,51	156,72 ± 9,67 ^b
1	82,14 ± 11,11	124,59 ± 0,62
3	99,45 ± 6,18	135,74 ± 11,85 ^c
5	149,60 ± 7,14 ^c	276,41 ± 22,75 ^c
7	131,13 ± 2,87 ^b	150,25 ± 6,92 ^b
9	157,89 ± 7,62 ^b	92,87 ± 2,44

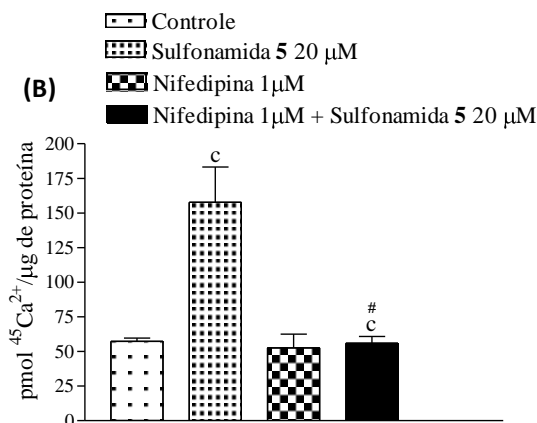
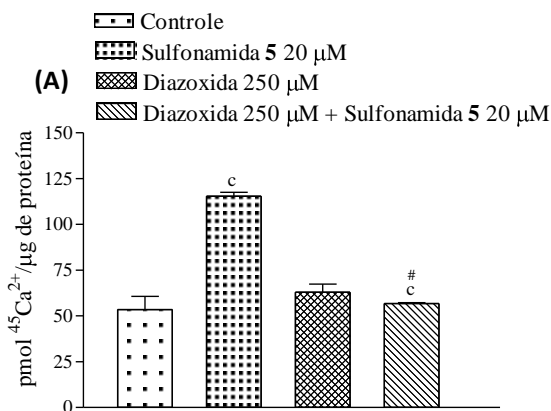
Cada valor representa a média ± E.P. M. de quatro determinações. ^bp ≤ 0,01 e ^cp ≤ 0,001 comparado com o grupo controle.

O cálcio é conhecido por estar envolvido na secreção de insulina em células beta. Com a finalidade de estudar o papel dos canais de K⁺-ATP no efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação de cálcio, a diazoxida, um agonista de canais de K⁺-ATP, foi usado. Sob esta condição experimental, diazoxida, na dose de 250 µM (Anello, Gilon e Henquin, 1999) suprimiu o aumento da captação de cálcio gerado pela sulfonamida **5** (Figura 4.1A). Isto indica que o canal de K⁺-ATP é essencial para a ação desta sulfonamida. A diazoxida é utilizada para inibir a secreção de insulina inadequada, a fim de corrigir os níveis elevados de glicose (HIRAMATSU et al., 2000). Além disso, a diazoxida diminuiu a eficácia do ⁴⁵Ca²⁺ na exocitose da insulina, como descrito anteriormente (OLOFSSON, et al., 2004).

A sequência de eventos desencadeada pelo composto **5** em relação à captação de cálcio também foi verificada na presença de nifedipina, um bloqueador clássico CCDV. Nifedipina 0,1 e 10 µM não mostraram efeito inibitório significativo nos CCDV (dados não apresentados). Na Figura 4.1B, 1 µM nifedipina aboliu completamente o efeito estimulatório do composto **5**. Assim, os canais de cálcio do tipo L parecem formar parte do mecanismo de ação da captação de cálcio em células beta induzida pela sulfonamida **5**. Além disso, a sulfonamida 2254RP estimula a secreção de insulina através do bloqueio de canais K⁺-ATP na membrana plasmática da célula beta, causando despolarização, abertura dos VDCCs do tipo-L, levando à captação de ⁴⁵Ca²⁺ e a um aumento na concentração citoplasmática de ⁴⁵Ca²⁺ (HENQUIN, 1992). Os

resultados presentes são de grande importância uma vez que o mecanismo de ação da sulfonamida **5** segue um comportamento de captação de cálcio semelhante ao estimulada pela glibenclâmida.

Figura 4.1: Envolvimento dos canais K^+ -ATP e dos CCDV do tipo L no efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. (A), diazoxida (250 μM) (B), nifedipina (1 μM) estavam presentes nos último 15 min de pré-incubação e durante o período de incubação. Tempo de pré-incubação: 60 min, incubação: 10 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. $^c p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. $^{\#}$ Comparado com o grupo sulfonamida **5**.



A fim de verificar a participação de cálcio intracelular no efeito estimulatório de sulfonamida **5** na captação de cálcio, BAPTA-AM, um quelante de cálcio intracelular, foi usado. A Figura 2A mostra que BAPTA-AM inibiu parcialmente o efeito estimulatório da sulfonamida **5**. Este resultado reforça a importância da influência do cálcio extracelular no mecanismo de ação de sulfonamida **5** nas células dos ilhotas pancreáticas.

MENDEZ et al., (2003) relataram que a associação rápida da proteína cinase C, com grânulos de insulina é essencial para a exocitose da insulina induzida pela glibenclamida. A fim de investigar a influência de PKC na captação de cálcio, RO-31820 (50 μ M), um inibidor de PKC, foi usado. Como pode ser visto na Figura 4.2B, este inibidor diminuiu a captação de cálcio estimulada pela sulfonamida **5** aproximadamente 60%. Além disso, foi demonstrado que a fosforilação da PKC modula os CCDV do tipo L em células beta (ARKHAMMAR et al., 1994; BENES et al., 1999). Em concordância, ARKHAMMAR et al. (1994) relataram que, em células beta de rato, a aplicação aguda de um ativador de PKC não afetou a atividade dos CCDV. No entanto, os mesmos autores relataram que a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ através dos CCDV em células beta diminuiu drasticamente após a depleção de PKC, corroborando o envolvimento da PKC na atividade dos CCDV.

Figura 4.2: Envolvimento do cálcio intracelular e via de sinalização da PKC no efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. (A), BAPTA-AM (50 μM) (B), RO-31820 (50 μM) estavam presentes nos último 15 min de pré-incubação e durante o período de incubação. Tempo de pré-incubação: 60 min, incubação: 10 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. $^c p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. $^{\#}$ Comparado com o grupo sulfonamida **5**.

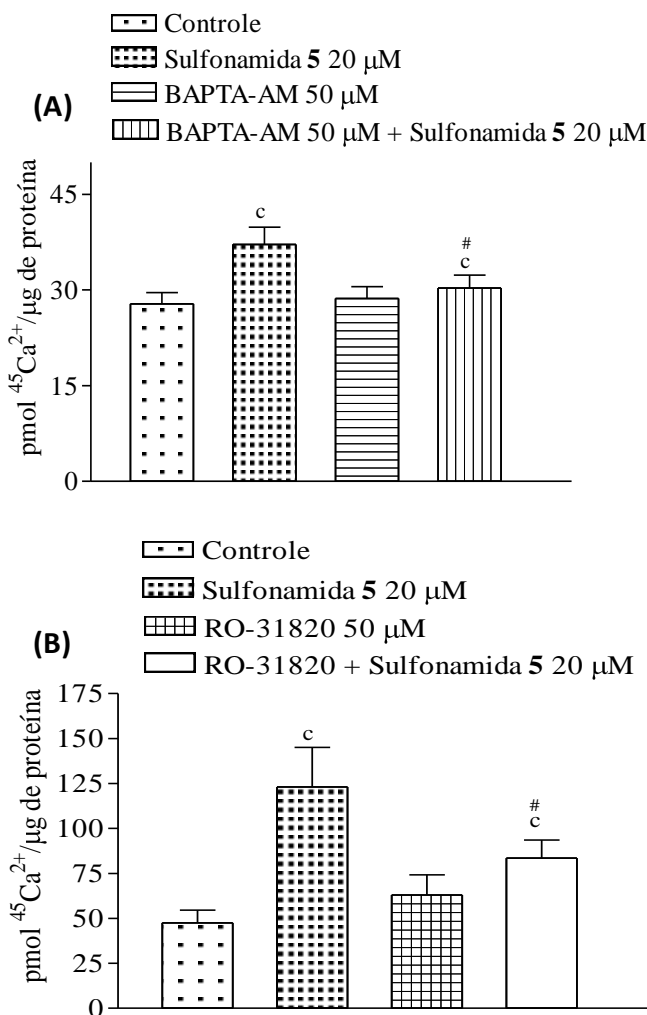
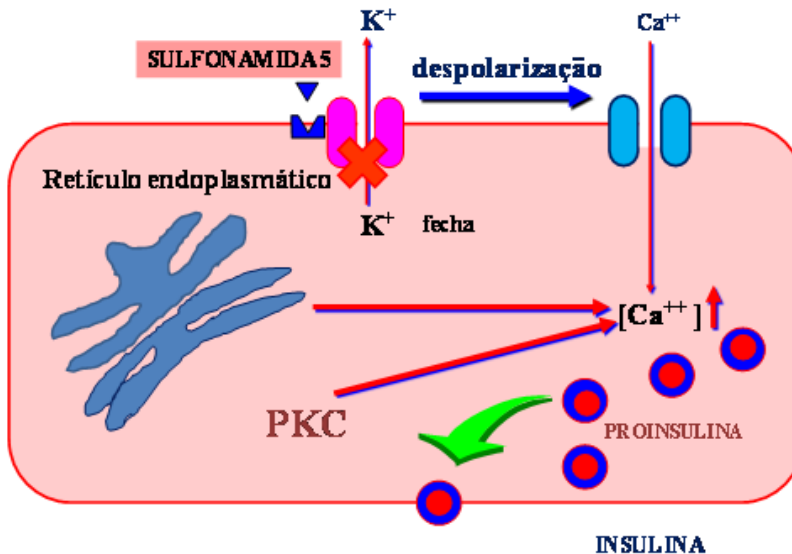


Figura 4.3. Modelo hipotético do mecanismo de ação da sulfonamida **5** em células beta. Envolvimento dos canais K^+ -ATP, dos canais de cálcio tipo L dependentes de voltagem, do cálcio intracelular e da via de sinalização da PKC no efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação $^{45}Ca^{2+}$. K^+ -ATP: canais de potássio sensíveis ao ATP, K^+ : íon potássio, Ca^{2+} : íon cálcio, PKC: proteína cinase C.

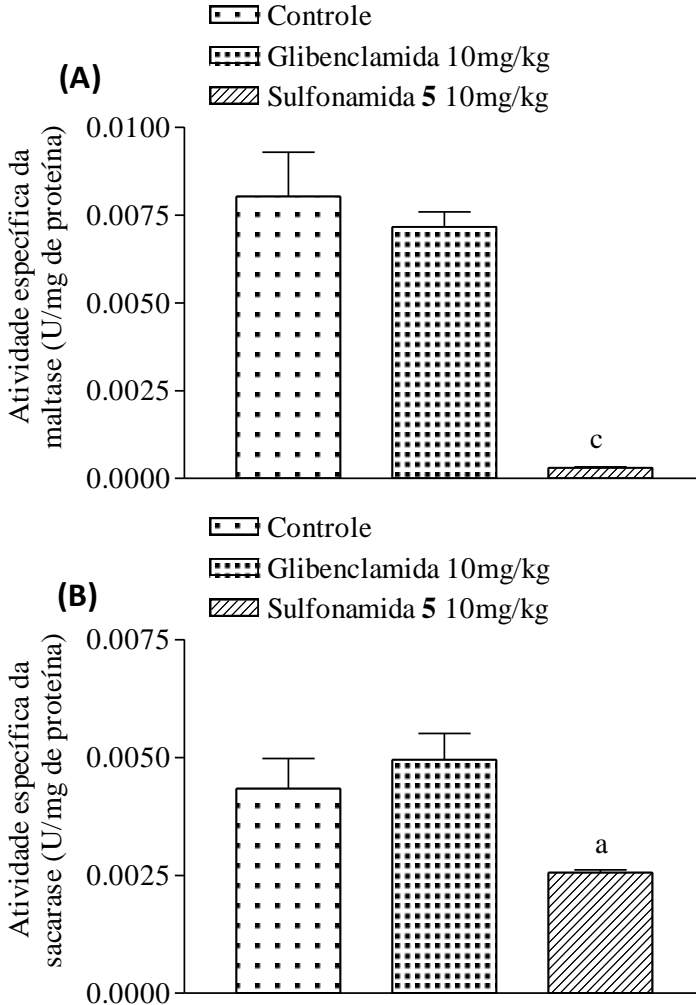


4.4.4 Efeito de derivados da sulfonamida na atividade de dissacaridases

Uma série de estudos demonstram que a atividade das dissacaridases como a sacarase e a isomaltase estão anormalmente elevadas no intestino delgado de pacientes diabéticos (DYER et al., 2002) e em modelos animais de diabetes (LIU et al., 2010; HAMDEN et al., 2011; DENG et al., 2011). Evidências *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a deficiência de insulina induz aumento anormal da atividade e da expressão das dissacaridases intestinais em estados diabéticos (LIU, et al., 2011). Além disso, os pacientes diabéticos controlados com insulina ou glibenclâmida demonstraram uma queda nos valores da atividade e da expressão das dissacaridases para valores normais (TANDON, SRI-

VASTAVA e PANDEY 1975). A sulfonamida **5** diminuiu notavelmente a atividade da maltase (cerca de 95%, Figura 4.4A), bem como a atividade da sacarase (cerca de 40%, Figura 4.4B). Por outro lado, o tratamento agudo com a glibenclamida não teve nenhum efeito na atividade de dissacaridases. Estes resultados são contrários aos relatados por TANDON, SRIVASTAVA e PANDEY (1975), que demonstraram o efeito inibitório do tratamento com glibenclamida nas dissacaridases intestinais em biópsias de humanos. Isto pode ter ocorrido por diversos motivos, entre estes: no estudo de TANDON, SRIVASTAVA e PANDEY (1975) foi observado um efeito de um tratamento crônico da glibenclamida em humanos; e na Figura 4.4 A e B é observado o efeito de um tratamento agudo em animais. Além disto, este efeito da glibenclamida sobre as dissacaridases em humanos pode ter ocorrido pelo aumento da secreção de insulina. A partir destes relatos, foi sugerido que a sulfonamida **5** atua diretamente na atividade do dissacaridases intestinais.

Figura 4.4. Efeito da sulfonamida **5** e da glibenclamida na atividade da maltase (A) e da sacarase (B), na porção do duodeno do intestino de rato. Tempo de incubação, 5 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 4$ para cada grupo. ^a $p \leq 0,05$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.



4.4.5 Efeito dos derivados da sulfonamida no conteúdo de glicogênio

Considerando o efeito da glibenclamida na síntese de glicogênio no fígado relatado por ABDEL AZIZ et al. (1996), foram investigados os efeitos insulinomiméticos no fígado e no músculo esquelético. A Tabela 4.4 mostra que não existe qualquer aumento no conteúdo de glicogênio no fígado após o tratamento com os compostos **1**, **3**, **5**, **7**, **9** ou glibenclamida em comparação com o grupo controle hiperglicêmico. Por outro lado, os compostos **1**, **5**, **7** e a glibenclamida aumentaram significativamente o conteúdo de glicogênio no músculo sóleo, sendo que a sulfonamida **5** teve um efeito de maior magnitude. Este efeito pode ser uma consequência da secreção de insulina induzida pela sulfonamida **5** (Tabela 4.2). O efeito secretagogo da sulfonamida **5** verificado nesta abordagem foi confirmado uma vez que nenhuma alteração na glicemia foi observada em ratos diabéticos (Tabela 4.1). A glibenclamida também aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio no músculo esquelético, mas não no fígado. Além disso, a partir de uma série de análogos de chalcona estudados em uma abordagem experimental semelhante relacionada com ao diabetes (DAMAZIO et al., 2010; LAZZAROTTO, HEINZEN e YUNES 2005), nenhum composto foi capaz de exibir um efeito bioquímico duplo como este da sulfonamida, para melhorar o estado do diabetes. Assim, estes resultados indicam que, além do potencial de ação da secretagogo de insulina, um efeito insulinomimético deste composto pode ser ativado no músculo esquelético. Tanto quanto sabemos, esta é a primeira descrição no efeito duplo (secretagogo de insulina e insulinomimético) de uma sulfonamida, em um tratamento *in vivo*.

Tabela 4.4. Efeito dos derivados da sulfonamida (10 mg/kg) no conteúdo de glicogênio em ratos *Wistar* em jejum. Cada valor representa a média \pm E.P. M. de quatro determinações. ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico.

Grupo	Músculo	Fígado
Hiperglicêmico	8.60 ± 1.00	14.60 ± 1.27
Glibenclamida	$17,46 \pm 1.80^c$	8.71 ± 1.49
1	15.07 ± 1.30^b	10.46 ± 0.44
3	5.60 ± 0.24	14.94 ± 1.30
5	19.31 ± 1.30^c	11.72 ± 2.10
7	17.02 ± 0.55^c	6.49 ± 1.47
9	8.43 ± 0.23	11.13 ± 0.78

4.4.6 Efeito dos derivados da sulfonamida na atividade da LDH

Finalmente, a toxicidade do tecido foi analisada, medindo a atividade da LDH no meio de incubação e no soro. A atividade da enzima LDH permaneceu inalterada pela sulfonamida **5** e pela glibenclamida para todos os períodos estudados *in vitro* e nas condições *in vivo* (Tabela 4.5). Além disso, o tratamento *in vivo* com os derivados de sulfonamida de **1**, **3**, **7** e **9** não alteraram a atividade da LDH.

Tabela 4.5. Efeito *in vivo* e *in vitro* dos derivados da sulfonamida na atividade da LDH extracelular no soro e no meio de incubação em ilhotas pancreáticas. Cada valor representa a média \pm E.P. M. de quatro determinações.

Grupo	LDH % do controle	Tempo (min)
<i>In vivo</i> (10 mg/kg)	10	180
Glibenclamida	-	33.50 ± 3.60
1	-	110.26 ± 3.74
3	-	84.79 ± 3.86
5	-	101.00 ± 6.14
7	-	110.67 ± 2.90
9	-	73.04 ± 5.61
<i>In vitro</i> (20 μ M)		
Glibenclamida	64.71 ± 4.70	35.88 ± 3.04
Sulfonamida 5	$56,89 \pm 8.10$	3.08

4.5 CONCLUSÕES

Em resumo, nós projetamos uma família de sulfonamidas baseada em um fragmento glibenclamida, em que aplicou a estratégia do bioisosterismo para obter potenciais agentes hipoglicemiantes. Seguindo os estudos na curva de tolerância à glicose, derivados da sulfonamida **1**, **3**, **5**, **7** e **9** foram selecionados para investigar a secreção de insulina, a captação de cálcio em células beta, o conteúdo de glicogênio e a atividade da LDH. A sulfonamida **5**, substituída com o grupo 4-OCH₃-fenilo, mostrou atividade biológica notável, tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo*, esta sulfonamida reduziu os níveis de glicose no soro de ratos em jejum (curva de tolerância oral). Além disso, este composto aumentou a secreção de insulina e o conteúdo de glicogênio muscular. A sulfonamida **5** também reduziu a atividade das dissacaridases intestinais. O efeito estimulatório da sulfonamida **5** na captação de cálcio é mediada por canais de K⁺ dependentes de ATP, canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo L, pelo cálcio intracelular e pela proteína cinase C em células beta nas ilhotas pancreáticas (Figura 4.3). Em conjunto, esses dados apontam para alvos múltiplos da sulfonamida **5** envolvidos na homeostase da glicose. O perfil farmacológico da sulfonamida **5** mostrou que este composto pode ser útil no tratamento do diabetes como um agente secretagogo de insulina e como um agente insulinomimético.

5. SULFONAMIDA 11 ESTIMULA A CAPTAÇÃO DE GLICOSE VIA CANAIS DE POTÁSSIO DEPENDENTES DE ATP

ARTIGO: A SER SUBMETIDO

Periódico: Current Medicinal Chemistry

FREDERICO MJS, LUZ G, CASTRO A, ALTENHOFEN D, MENDES C, MASCARELLO A, YUNES RA; NUNES RJ; SILVA FRMB.

A sulfonamida 11 estimula a captação de glicose no tecido adiposo via canais de potássio dependentes de ATP

Marisa Jádna Silva Frederico¹; Gabrielle Da Luz¹; Allisson Jhonatan Gomes Castro¹; Delsi Altenhofen¹; Camila Pires Mendes¹; Adair Roberto Soares dos Santos³; Alessandra Mascarello²; Rosendo Augusto Yunes²; Ricardo José Nunes²; Fátima Regina Mena Barreto Silva^{1*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

³Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

Resumo

Sulfonilureia e derivados de tioureia substituída com grupos benzeno-sulfonamidas aumentam a captação de glicose no tecido adiposo de ratos. No entanto, o efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose não é conhecido. O objetivo do estudo foi caracterizar o mecanismo de ação deste composto na captação de glicose no tecido adiposo e a capacidade de reduzir os produtos finais de glicação avançada (AGEs). Material e Métodos: Fatias de tecido adiposo epididimal foram pré-incubados e incubados a 37°C em tampão Krebs Ringer bicarbonato e a captação de ^{14}C -desoxi-D-glicose (^{14}C -DG; 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$) foi estudada na ausência (controle) ou presença da sulfonamida **11** (1, 10, 100 μM) e de inibidores/ativadores de proteínas cinases. Para os experimentos de curso em tempo na formação de AGEs foi medida a fluorescência característica da formação de produtos finais de glicação avançada no sistema de albumina sérica bovina/glicose. Resultados: O efeito estimulatório da sulfonamida **11** (10 μM) na captação de ^{14}C -DG foi anulado por diazoxida, wortmanina, PD98059, colchicina e N-etilmaleimida. Por outro lado, o efeito da sulfonamida **11** não foi bloqueado por glibenclâmida, um inibidor dos canais K^+ -ATP, ou pelo inibidor da proteína p38 MAPK, o SB 203580. A sulfonamida **11** reduziu a formação de produtos finais de glicação avançada, nas concentrações de 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$ em 7, 14 e 28 dias de incubação. O efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose no tecido adiposo envolve a ativação de canais K^+ -ATP e a ativação da translocação e fusão de vesículas de GLUT4 na membrana plasmática do adipócito.

Palavras chave: Sulfonamida **11**, captação de glicose, canais K^+ -ATP.

5.1 INTRODUÇÃO

A descoberta do efeito hipoglicemiante da sulfonamida em alguns pacientes administrados com p-amino-benzeno-sulfonamida-isopropiltiodiazol (2254 RP) marcou um período importante em relação ao tratamento do diabetes (rev. em [LOUBATIÈRES-MARIANI, 2007]). RP 2254 se tornou a primeira sulfonamida clinicamente útil no tratamento do DM. Estudos demonstraram que a sucessão de ações desencadeadas por RP 2254 nas células beta era comparável ao induzido por sulfonilureias de primeira ou segunda geração (HENQUIN, 1992). Além disso, a estrutura química fundamental da sulfonamida é semelhante ao dos compostos antidiabéticos, sulfonilureias, previamente estudadas (HENQUIN, 1992; FREDERICO et al., 2013).

É conhecido que as sulfonilureias aumentam a utilização da glicose pelo tecido muscular e em cultura de células musculares mediado pela insulina (FELDMAN, LEBOVITZ e DURHAM 1969; WANG et al., 1989) por um mecanismo independente do receptor de insulina (BAK et al., 1989). Em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, o tratamento com gliclazida, uma sulfonilureia de segunda geração, aumentou a captação de glicose no músculo esquelético e apresentou um efeito aditivo ao da insulina (PULIDO et al., 1997). Além disso, PULIDO et al. (1996) relataram um efeito direto e rápido, dependente da concentração das sulfonilureias, na captação de glicose em músculo esquelético de ratos.

As sulfonilureias promovem o movimento dos transportadores de glicose para a membrana plasmática em adipócitos e em miócitos em cultura (ROGERS, STANDAERT e POLLET 1987; MULLER e WIED, 1993). PULIDO et al. (1996) mostraram que a gliclazida promoveu o movimento do GLUT4 para a membrana plasmática em músculo gastrocnêmio. ZHANG et al. (2009) verificaram que os derivados de sulfonilureia e de tioureia substituídos com grupos benzenossulfonamidas estimulam a captação de glicose através de GLUT em adipócitos de ratos.

Em um estudo anterior, foi projetada uma família de sulfonamidas baseado em um fragmento de glibenclamida como potenciais agentes hipoglicemiantes, agindo em alvos múltiplos envolvidos no metabolismo da glicose (FREDERICO et al., 2013). No entanto, se as novas sulfonamidas estimulam a captação de glicose, ainda é desconhecido.

Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar se a sulfonamida **11** ativa enzimas intracelulares implicadas na captação de glicose pelo tecido adiposo e avaliar o efeito na glicação no sistema albumina sérica/glicose *in vitro*.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

A glibenclamida, a diazoxida, a wortmanina, o (1-[6-[(17 β)-3-metoxiestra-1,3,5[10]-trien-17-il)amino]hexil]-1H-pirrol-2,5-diona) U-73122, (2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirran-4-ona), o PD98059, (-1-(trans-4 hidroxíciclo-hexil) -4-(4-fluorofenil) -5-(2-etoxipiridimidina-4)-imidazol), o SB239063, a colchicina e o N-etilmaleimida foram adquiridos a partir de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). HNMPA(AM)3 (hidroxi-2-naftalenilmetilfosfonacitris-acetoxi-metiléster) foi adquirido pela Enzo Life Sciences (Nova Iorque, EUA). [U-¹⁴C]-2-desoxi-D-glicose ([¹⁴C]-DG), a atividade específica de 10,6 GBq/mmol e o líquido de cintilação biodegradável foram obtidos de Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, EUA). Os sais e os solventes foram adquiridos a partir de Merck® AG (Darmstadt, Alemanha).

Para os experimentos *in vitro*, a sulfonamida **11** foi dissolvida em DMSO. O DMSO foi adicionado aos demais grupos em concentrações finais não superiores a 0,1% (v/v).

5.2.2 Os animais experimentais

Ratos *Wistar* albinos (180-210 g; 48-50 dias de idade) foram criados em um biotério setorial com ar condicionado (aproximadamente 21 \pm 2 °C) e iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os ratos foram mantidos com ração peletizada (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil) e água de torneira *ad libitum*. Para tratamentos *in vivo* os ratos foram privados de alimentos durante pelo menos 16 h, mas com o acesso livre à água. Todos os animais foram monitorados e mantidos de acordo com a lei Lei Arouca n.º 11.794/08 seguindo as recomendações

éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA protocolo PP00414/UFSC).

5.2.3 Captação de glicose no músculo sóleo e tecido adiposo

Para os experimentos de captação de [U- 14 C]-2-desoxi-D-glicose, músculo sóleo e tecido adiposo de ratos normais em jejum foram utilizados. Músculos sóleo foram distribuídos (esquerda e direita alternadamente) entre grupos controles e tratados. Os músculos foram dissecados, pré-incubados durante 30 min e incubados por 60 min a 37 °C em tampão KRb suplementado com 3 mM de glicose, pH 7,4 e atmosfera de O₂/CO₂ (95%: 5%, v/v). Primeiro, a sulfonamida **11** (1, 10 e 100 µM) foi adicionada ao meio de incubação 14 C-DG (0,1 µCi/mL, 60 min), durante 60 min, para se obter a curva dose-resposta. Depois, diferentes fármacos, tais como 100 µM diazoxida, 20 µM glibenclamida, 100 µM HNMPA(AM)3, 100 nM wortmanina, 1 µM U73122, 10 µM SB239063, 1 µM colchicina e 1 mM de N-etilmaleimida, foram adicionados ao meio de pré-incubação (30 min) e incubação (60 min), na presença ou ausência de 20 µM do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida com 14 C-DG (0,1 µCi/mL). As amostras foram processadas de acordo com FREDERICO et al. (2012). Os resultados foram expressos em nmol de glicose/mg de proteína.

5.2.4 Formação de produtos finais de glicação avançada nos sistemas de albumina bovina sérica/glicose

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) foram formados no sistema *in vitro*, utilizando um método anteriormente descrito (KIHIO et al., 2004). Resumidamente, 10 mg/mL de albumina sérica bovina BSA em tampão fosfato-salina (PBS, pH 7,4) contendo azida sódica a 0,02% foram incubados com glicose (500 mM) a 37 °C durante 7, 14 e 28 dias, na ausência (controle) e na presença de a sulfonamida **11** (0,1 e 1,0 µg/mL). A proteína, a glicose e a sulfonamida **11** foram introduzidas simultaneamente na mistura da incubação. Cada solução foi mantida no escuro em um frasco tampado, e a incubação foi deixada decorrer em frascos em triplicata. Para os experimentos de curso em tempo na formação de AGEs, foi medida a fluorescência característica (comprimento

de onda de excitação de 370 nm e comprimento de onda de emissão de 440 nm) com Infiniti M200 (TECAN).

5.2.5 Análises estatísticas

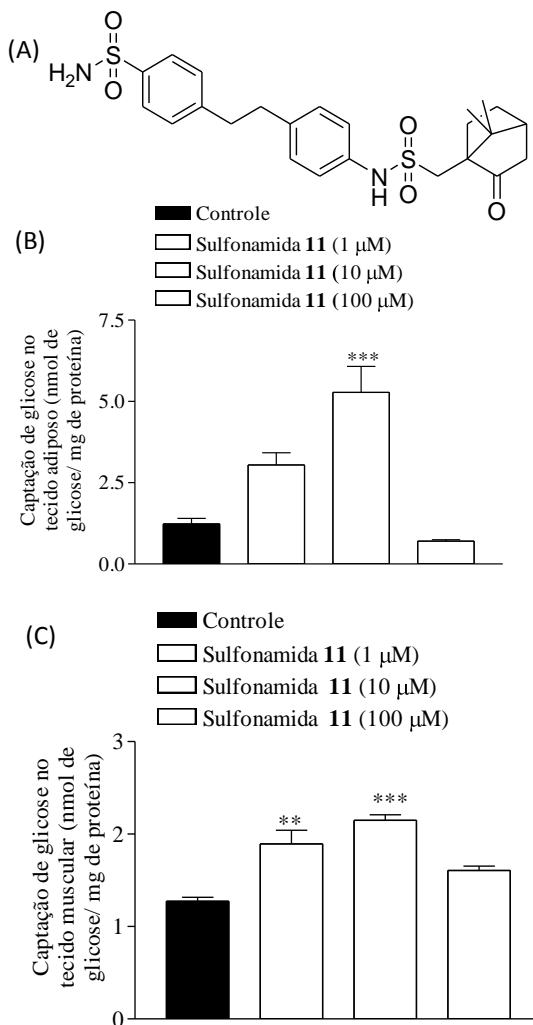
Os resultados foram expressos como a Média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificado nas figuras. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor do que 0,05.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Mecanismo de ação da sulfonamida **11** na captação de glicose

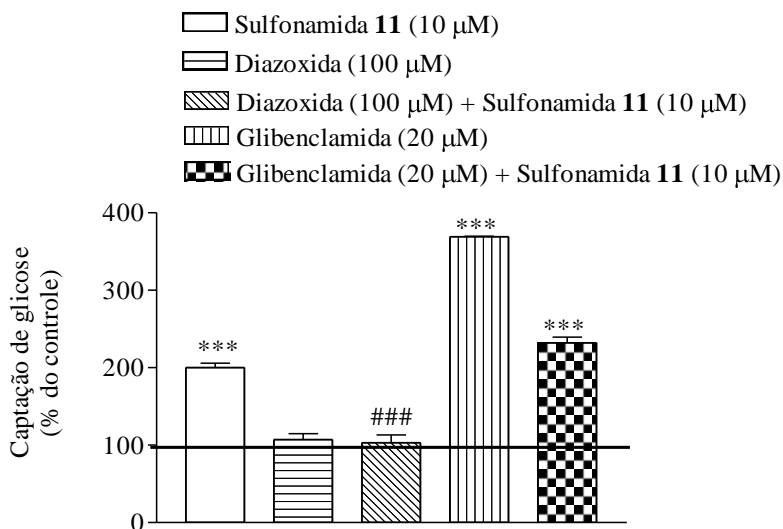
A sulfonamida **11** se destacou por sua notável atividade anti-hiperglicêmica, recentemente relatado por FREDERICO et al. (2013). Neste estudo foi analisado o mecanismo de ação sulfonamida **11** na captação da glicose no tecido adiposo (Figura 5.1A). Inicialmente, uma curva dose-resposta da sulfonamida **11** (1, 10 e 100 μ M), foi realizada em tecido adiposo e em músculo esquelético de rato após 60 min de incubação com 14 C-DG (0,1 μ Ci/mL) (Figura 5.1B e C). O efeito estimulatório da sulfonamida **11** na concentração de 10 μ M foi de aproximadamente 430% quando comparado com o grupo controle. No entanto, não foi encontrado nenhum efeito significativo da sulfonamida **11** sobre a captação de glicose com a concentração mais baixa e mais alta utilizada (Figura 5.1B). Na Figura 5.1C, a sulfonamida **11** aumentou da captação da glicose em de cerca de 150 e 170% nas concentrações de 1 μ M e 10 μ M em músculo esquelético, respectivamente. Baseado nestes resultados, a concentração de 10 μ M sulfonamida **11** foi usada para estudos *in vitro*, no tecido adiposo.

Figura 5.1. (A), Estrutura química da Sulfonamida **11**. (B) Efeito estimulatório da Sulfonamida **11** (1, 10 e 100 μM) na captação de glicose no tecido adiposo e (C) no tecido muscular *in vitro*. Tempo de pré-incubação: 30 min. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ e ** $p \leq 0,01$ em relação ao grupo controle.



Para avaliar o envolvimento de canais de potássio no efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose, a diazoxida (250 μM), um agonista dos canais de K^+ -ATP e a glibenclamida (20 μM), um bloqueador de canais de K^+ -ATP (FREDERICO et al., 2013), foram utilizados (Figura 5.2). Como pode ser observado, a diazoxida bloqueou completamente o efeito estimulatório da sulfonamida **11** no tecido adiposo. A glibenclamida não parece alterar o efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose.

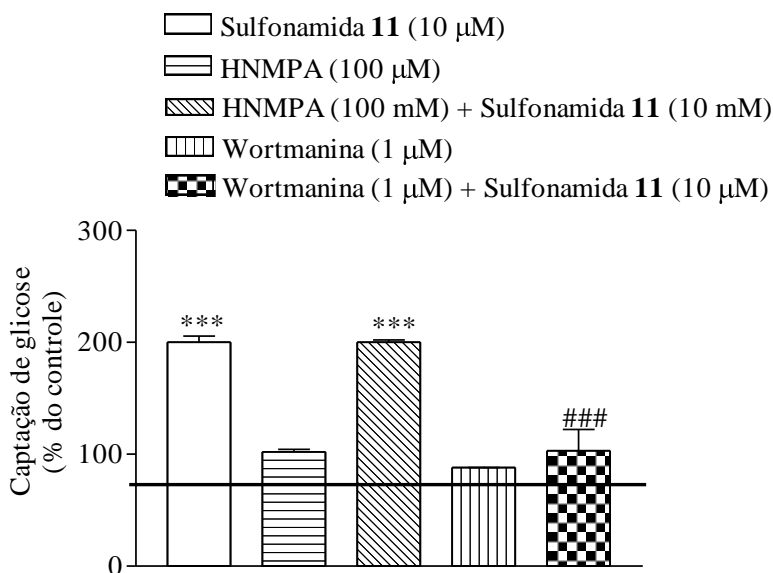
Figura 5.2. Efeito estimulatório da sulfonamida **11** nos canais de K^+ -ATP sobre a captação de glicose no tecido adiposo. Diazoxida (100 μM), agonista dos canais de K^+ -ATP, e a glibenclamida (20 μM), bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao ATP. Tempo de pré-incubação: 30 min. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle, ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo sulfonamida **11**.



A influência da sulfonamida **11** na via de sinalização da insulina sobre a captação da glicose foi investigada. Como mostrado na Figura 5.3, o efeito estimulatório da sulfonamida **11** não foi bloqueado na presença de 100 μM HNMPA, um inibidor do receptor de insulina. Por

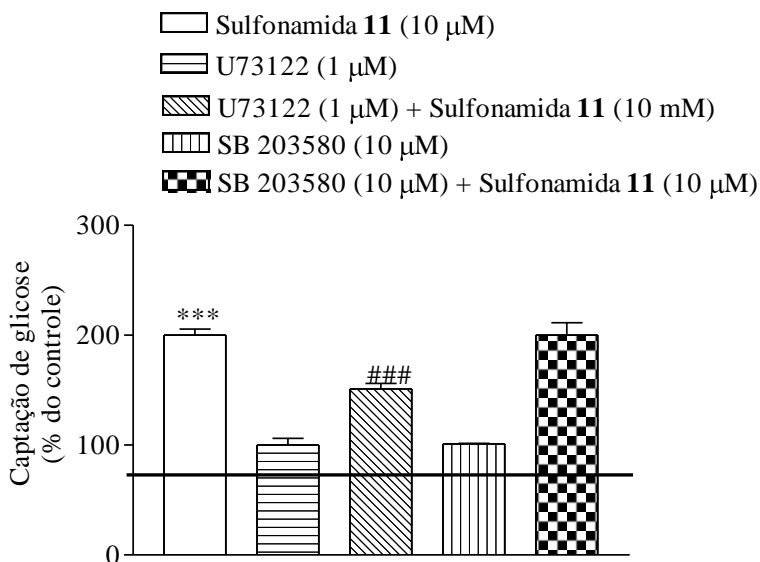
outro lado, 1 μM wortmanina, um inibidor da PI 3-K (CAZAROLLI et al., 2013), bloqueou aproximadamente 60% do efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose.

Figura 5.3. Efeito estimulatório da sulfonamida **11** na via de sinalização da insulina sobre a captação de glicose no tecido adiposo. HNMPA (100 μM), inibidor do receptor da insulina, e wortmanina (1 μM), inibidor da PI 3-K. Tempo de pré-incubação: 30 min. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle; ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo sulfonamida **11**.



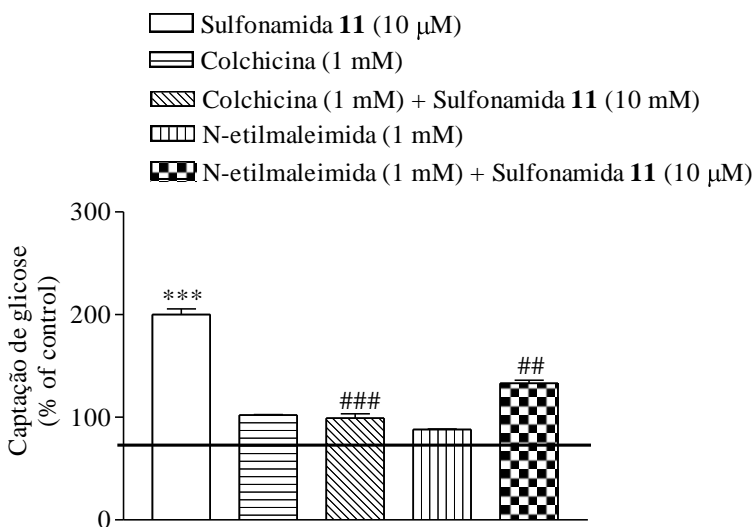
A fosfolipase C- γ (PLC- γ) é um alvo downstream da PI 3-K na sinalização da insulina (EICHHORN et al., 2002). O pré-tratamento com 1 μM de U73122, um inibidor da fosfolipase C (PLC) (FREDERICO et al., 2012), bloqueou parcialmente o efeito estimulatório da sulfonamida **11**. Por outro lado, 10 μM de SB203580 (CAZAROLLI et al., 2013), um inibidor de p38 MAPK, não alterou o efeito estimulatório da sulfonamida **11** no tecido adiposo (Figura 5.4).

Figura 5.4. Envolvimento da PLC- γ e da p38 MAPK no efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose. U73122 (1 μ M), inibidor da fosfolipase C e SB203580 (10 μ M) inibidor da p38 MAPK. Tempo de pré-incubação: 30 min. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle controle, ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo sulfonamida **11**.



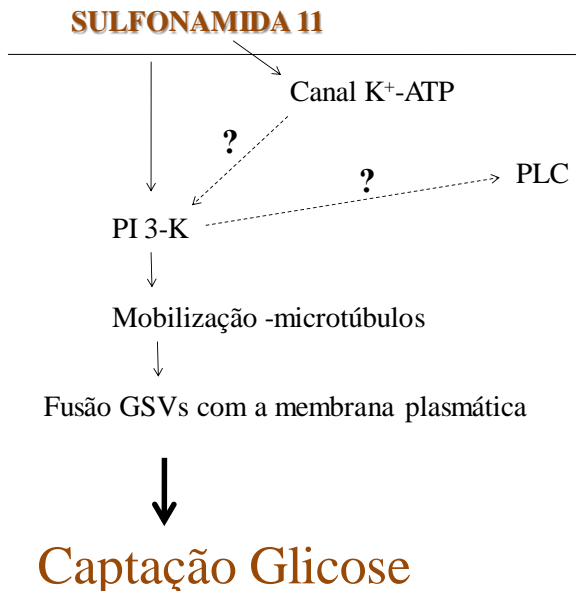
Finalmente, o efeito estimulatório da sulfonamida **11** sobre a captação de glicose no tecido adiposo foi bloqueado na presença de 1 mM de colchicina, um agente de despolimerizador de microtúbulos, e N-etilmaleimida, bloqueador do transporte vesicular; inibiu a captação de glicose em torno de 66% (Figura 5.5).

Figura 5.5. Efeito da sulfonamida **11** na via de translocação do GLUT4 sobre a captação de glicose no tecido adiposo. Colchicina (1 mM) agente despolimerizador de microtúbulos e N-etilmaleimida (1mM) um agente bloqueador do transporte vesicular. Tempo de incubação: 60 min. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle, ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo Sulfonamida **11**.



A Figura 5.6 demonstra um resumo do mecanismo de ação exercido pela sulfonamida **11** no tecido adiposo para a captação da glicose.

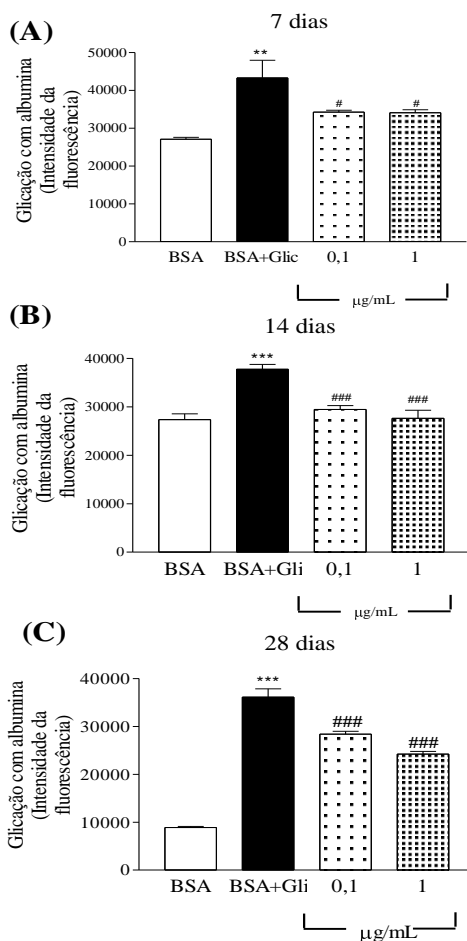
Figura 5.6. Hipótese da via de sinalização da sulfonamida **11** sobre a captação de glicose no tecido adiposo. Flechas pontilhadas indicam caminho desconhecido, setas finas indicam a via de sinalização necessária para a captação de glicose no tecido adiposo estimulada pela sulfonamida **11**. K⁺-ATP: canais de potássio sensíveis ao ATP, PLC: fosfolipase C, PI 3-K: proteína cinase 3 fosfatidil-inositol, GSVs: vesículas contendo GLUT4.



No método utilizado no presente estudo, a albumina bovina sérica (BSA) foi escolhida como a proteína modelo e a glicose foi utilizada como o agente glicador. O sistema BSA de açúcares redutores é um modelo *in vitro* amplamente utilizado em estudos de glicação não enzimáticos. As proteínas podem ser modificadas quando expostas a açúcares redutores pelo processo de glicação espontânea. A intensidade de fluorescência mediada pelo açúcar, que é uma característica dos produtos AGEs, aumenta durante a incubação a 37 °C durante um longo período. Na Figura 5.7 - A, B, e C, a intensidade de fluorescência dos AGEs formados no modelo BSA - glicação pode ser observada. Após incubação dos períodos analisados (7, 14 e 28 dias), a formação de AGEs foi significativamente aumentada no grupo BSA/glicose (Figura 5.7 A, B e C), quando comparado com o grupo de controle basal. A Figura 5.7 A,

B e C mostra a capacidade *in vitro* da sulfonamida **11** em suprimir a formação de AGEs no sistema de BSA/glicose em todas as concentrações, durante todo o período do estudo.

Figura 5.7. Efeito inibitório da sulfonamida **11** na formação de AGEs fluorescentes em um sistema de BSA/glicose. A, B e C correspondem a 7, 14 e 28 dias de incubação com BSA/glicose, respectivamente. Médias \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle controle (BSA), ### $p \leq 0,001$ em relação ao grupo BSA + grupo glicose.



5.4 DISCUSSÃO

Alguns estudos demonstram que as sulfonilureias aumentam a captação de glicose pelo músculo esquelético e adipócitos mediada pela insulina (MULLER e WIED, 1993; RODRIGUEZ et al., 2004). Além disso, foi mostrado um efeito dependente da concentração das sulfonilureias na captação de glicose pelo músculo esquelético, independente da presença de insulina (DANIELS e LEWIS, 1982; PULIDO et al., 1996). Sulfonilureias e derivados de tioureia substituídos com grupos benzeno-sulfonamidas aumentam a captação de glicose no tecido adiposo de ratos (ZHANG et al., 2009). O presente estudo teve como objetivo caracterizar as vias de sinalização intracelulares envolvidas no efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação de glicose e avaliar o efeito na glicação com albumina sérica *in vitro*. Esta é a primeira demonstração de que uma sulfonamida aumenta acentuadamente a captação de glicose no tecido adiposo (10 μ M) e no músculo esquelético (10 μ M e 100 μ M).

Canais de K^+ -ATP podem estar envolvidos na captação de glicose no músculo esquelético. Usando camundongos Kir6.2(-/-), MIKI et al. (1998) encontraram que o efeito de redução da glicemia pela insulina é intensificado em camundongos Kir6.2(-/-). O envolvimento de canais de K^+ -ATP na captação de glicose foi também visto em camundongos deficientes do gene SUR2 [SUR2(-/-)] (CHUTKOW et al., 2001). As sulfonamidas bloqueiam os canais de K^+ -ATP em células beta pela ligação ao Kir6.2 (HENQUIN, 1992; LOUBATIÈRES-MARIANI, 2007). FREDERICO et al. (2013) encontraram que o aumento do influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas pela sulfonamida **5** foi abolido na presença da diazoxida. Agonistas SUR demonstraram efeitos diretos nos adipócitos. Neste estudo a diazoxida bloqueou completamente o efeito estimulatório da sulfonamida **11** no tecido adiposo. Além disso, MIKI et al. (2002), revelaram que a captação de glicose no tecido adiposo em camundongos Kir6.2(-/-) também foi aumentada *in vivo*. Ainda, PULIDO et al. (1996) relataram que a captação da glicose estimulada por gliclazida no músculo esquelético foi bloqueada pela diazoxida. Por outro lado, o efeito da sulfonamida **11** na captação de glicose não foi alterado na presença de glibenclamida. Isto pode ter ocorrido porque a máxima ligação de sulfonilureias ao canal de K^+ -ATP é de cerca de 60-80% nas células beta (GRIBBLE, TUCKER e ASHCROFT 1997). Os resultados apresentados sugerem fortemente que a participação dos ca-

nais de K^+ -ATP desempenham um papel crucial no mecanismo de ação da sulfonamida **11** na captação de glicose em tecido adiposo.

A ação da sulfonamida **11** na captação de glicose no tecido adiposo não foi alterada por HNMPA. Por outro lado, o pré-tratamento com um inibidor de PI 3-K, wortmanina, bloqueou aproximadamente 60% da captação de glicose induzida pela sulfonamida. Desde modo, este estudo revelou que a PI 3-K desempenhou uma função importante na captação de glicose induzida pela sulfonamida. RODRIGUEZ et al. (2004) relataram que as sulfonilureias promovem o transporte de glicose no músculo esquelético através da ativação da PI 3-K. O mecanismo de captação da glicose induzido por glimepirida, uma sulfonilureia de terceira geração, em adipócitos, mostrou uma via de sinalização independente do receptor da insulina que inclui a fosforilação da tirosina do substrato receptor da insulina (IRS) -1/2 e a ativação da PI 3-K (MULLER et al., 2001).

Na Figura 5.4, o inibidor de PLC, U73122 bloqueou parcialmente o efeito estimulatório da sulfonamida **11**. Estudos anteriores sugerem o envolvimento da PLC específica glicosilfosfatidil-inositol na via de sinalização da sulfonilureias (MÜLLER e GEISEN, 1996). KAYALI et al. (1998) verificaram que U73122 pode inibir parcialmente a atividade endógena PI 3-K em adipócitos 3T3-L1. Além disso, em um estudo de RODRIGUEZ et al. (2004), o pré-tratamento dos músculos com U73122 bloqueou totalmente a captação de glicose estimulada por gliclazida. Outro alvo analisado neste estudo foi a p38 MAPK. Diversos estudos demonstraram a necessidade de ativação da p38 MAPK para a captação de glicose (SOMWAR et al., 2000; KONRAD et al., 2001; KUMAR e DEY 2002). Um inibidor de p38 MAPK, SB203580, reduziu a captação de glicose pela insulina, em adipócitos 3T3-L1 (SWEENEY et al., 1999) e células do musculares L6 (SOMWAR et al., 2000). Aqui, o efeito estimulatório da sulfonamida **11** não foi alterado na presença de um inibidor de p38 MAPK.

A insulina regula as duas etapas distintas na exocitose de vesículas contendo GLUT4 por mecanismos diferentes. O primeiro passo é a translocação de vesículas contendo GLUT4 a partir de locais de armazenagem intracelulares para a periferia da célula. O segundo passo é a fusão dessas vesículas com a membrana plasmática para a externalização do GLUT4 (para revisão, ver BOGAN, 2012). No presente estudo, para verificar o primeiro passo (translocação de GLUT4) usamos a colchicina, um agente despolimerizador de microtúbulos. Vários estudos demonstraram que alterações de microtúbulos induzida por colchicina e outros agentes de despolimerização dos microtúbulos inibem a translo-

cação de GLUT4 e a captação de glicose em adipócitos induzidas por insulina (FLETCHER et al., 2000; WATSON, KANZAKI e PESSIN 2004; HUANG et al., 2005). Neste estudo, a colchicina bloqueou o efeito estimulatório da sulfonamida **11** na captação da glicose. Este resultado sugere que a integridade do citoesqueleto é importante para a captação de glicose induzida pela sulfonamida **11**. Para verificar o segundo passo (fusão de vesículas contendo GLUT4 com a membrana plasmática e a externalização do GLUT4), utilizou-se a N-etilmaleimida, um agente bloqueador do transporte vesicular. A n-etilmaleimida reduziu aproximadamente 66% o efeito estimulante de sulfonamida **11**.

A hiperglicemia crônica é a característica mais comum de todas as formas do DM. Esta condição acelera a formação irreversível AGEs que desempenham um papel importante na patogênese das complicações diabéticas (HUEBSCHMANN et al., 2006). A busca de um potencial agente antiglicação tem atraído muita atenção dos pesquisadores. Aqui, a sulfonamida **11** exibiu notável efeito na redução dos AGEs em todos os períodos estudados. Entre as sulfonilureias, somente a gliclazida reduziu a formação de AGEs de glicose *in vitro* (LI et al., 2008). Este é um resultado importante, que indica que a sulfonamida **11** pode ter diferentes efeitos terapêuticos para o tratamento de diabetes.

5.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos sugerir que a sulfonamida **11** aumentou a captação de glicose no tecido adiposo através da indução de uma cascata complexa de sinalização intracelular. Estes envolvem os canais de K^+ -ATP, a PI 3-K, a PLC e as proteínas envolvidas na translocação e na fusão de vesículas contendo GLUT4 de locais de armazenamento intracelulares para a periferia celular (Figura 5.6). Além disso, esta sulfonamida reduz notavelmente os AGEs. Estes resultados sugerem que a sulfonamida **11** seja um alvo terapêutico atraente para o tratamento de diabetes. Estudos relacionados com o efeito potencial de secretagogo de insulina são necessários para elucidar o mecanismo complexo de ação desse composto para a homeostase da glicose.

**6. AS ACILHIDRAZONAS CONTRIBUEM PARA HOME-
OSTASIA DA GLICOSE ATRAVÉS DE DOIS ALVOS
FISIOLÓGICOS**

ARTIGO PUBLICADO

Periódico: Current Topics in Medicinal Chemistry

FREDERICO MJS; CASTRO AJG; MASCARELLO A; MENDES CP;
KAPPEL VD; STUMPF TR; LEAL PC; NUNES RJ; YUNES RA;
SILVA FMB.

Acylhydrazones Contribute to Serum Glucose Homeostasis Through Dual Physiological Targets

Marisa Jádna Silva Frederico¹, Allisson Jhonatan Gomes Castro¹, Alessandra Mascarello², Camila Pires Mendes¹, Virginia Dermachi Kappel¹, Taisa Regina Stumpf², Paulo Cesar Leal², Ricardo José Nunes², Rosendo Augusto Yunes² and Fátima Regina Mena Barreto Silva^{1,*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil; ²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Abstract: In this study the *in vivo* and *in vitro* antidiabetic effects of four acylhydrazone derivatives were investigated in rats. The secretagogue action, oral glucose tolerance, insulinogenic index and mechanism of action of these acylhydrazones in relation to calcium uptake in pancreatic islets were studied. Also, the insulinomimetic effect on glycemia in diabetic rats was verified. Of the acylhydrazones studied, 1 and 4 were able to increase glucose tolerance in an acute time-course. A powerful secretagogue effect was exhibited by 1 and glibenclamide with an insulinogenic index around 3.9 and 1.3-fold higher than that of the hyperglycemic group, respectively. Moreover, an acute and dose-dependent effect of glibenclamide and 1 on calcium uptake in pancreatic islets was observed. The rapid stimulatory effect of 1 on calcium uptake seems to be mediated, at least in part, by ATP-dependent K⁺ channels (K⁺-ATP) since the stimulatory effect of 1 was similar to that observed for glibenclamide but was not potentiated by sulphphonylurea. Furthermore, both extracellular and calcium from stocks mediate the signal transduction of stimulatory effect of 1 on calcium uptake which may contribute to insulin secretion. In addition, the insulinomimetic effect of 1 was evidenced through the level of serum glucose lowering in alloxan-induced diabetic rats. Also, 1 induced a significant increase in glycogen content *in vivo* and glucose uptake in soleus muscle *in vitro*. The results of this study indicate dual physiological targets for the acylhydrazone 1, i.e., pancreatic islets and skeletal muscle, as a result of insulin secretagogue and insulinomimetic action.

Keywords: Acylhydrazones, calcium, insulinomimetic, glucose, glycemia, pancreas, secretagogue, skeletal muscle.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a global health problem and one of the major causes of morbidity and mortality [1]. The incidence of the disease is high worldwide and varies between populations due to genetic and susceptibility differences as well as other modifiable risk factors [2, 3]. While the prevalence of DM has reached epidemic proportions, most available treatments still focus on the symptoms of the disease, rather than the underlying pathology itself. There are basically two types of diabetes, type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM). T2DM accounts for the vast majority of cases of diabetes, and is a heterogeneous disease marked by β -cell dysfunction [4, 5] combined with insulin resistance in target tissues [4, 6, 7]. The pathogenesis of the disease involves both genetic [8] and environmental factors, and is frequently associated with obesity [6, 9, 10, 11]. T1DM is characterized by the destruction of pancreatic β -cells due to T-cell-mediated auto-immune attack [12], which not yet fully understood.

Types 1 and 2 diabetes have in common a deficit in β -cell mass. While the etiologies associated with T1DM and T2DM differ, both forms are characterized by a relative deficit in functional β -cell mass such that the insulin requirements of the body are not met and glycemia is uncontrolled [13]. Thus, studies that aim to investigate the mechanisms of action of new compounds in insulin targets in order to highlight the diabetes treatments as well as improve glucose tolerance, either through improving the insulin secretory output of the remaining β -cells (insulin secretagogues), as well as improving the response to insulin in target tissues (insulin sensitizers), or replacing the missing insulin (exogenous insulinomimetic compounds), are of great importance in relation to this pathogenesis.

Acylhydrazones structural skeleton is similar to the antidiabetic compounds, chalcones, previously studied [14,15,16]. Acylhydrazones compounds presents a wide spectrum of biological properties including analgesic, anti-inflammatory, antithrombotic, anticonceptive and antiplatelet activity [17,18]. *N*-acylhydrazones have been shown to produce a cardio inotropic effect and vasodilation of vascular smooth muscle in rats [19]. Moreover, recently, the structure-activity relationships of 3,4,5-trimethoxy-hydrazones has been described, these compounds showing potent anticancer activity and the ability to provoke tubulin depolymer-

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970 - Florianópolis, Santa Catarina, Brazil; Tel: +55 48 3721.6912; Fax: +55 48 3721.9672; E-mail: mena@mbbox1.ufsc.br

As acilhidrazonas contribuem para homeostasia da glicose através de dois alvos fisiológicos

Marisa Jádna Silva Frederico¹; Alisson Jhonathan Gomes Castro¹; Alessandra Mascarello²; Camila Mendes¹; Virgínia Dermachi Kappel¹; Taisa Stumpf²; Paulo Cesar Leal²; Ricardo José Nunes²; Rosendo Augusto Yunes²; Fátima Mena Barreto Silva¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.

²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil.

Resumo

Neste estudo os efeitos antidiabéticos *in vivo* e *in vitro* de quatro derivados de acilhidrazonas foram investigados em ratos. A ação secretagoga, a curva de tolerância oral à glicose, o índice insulínogênico e o mecanismo de ação secretagogo em ilhotas pancreáticas foram estudados. O efeito insulínomimético na glicemia de ratos diabéticos também foi verificado. Entre as acilhidrazonas estudadas, a **1** e a **4** foram capazes de aumentar a tolerância à glicose em um curso de tempo agudo. Um efeito secretagogo notável foi mostrado pelo composto **1**, com um índice insulínogênico cerca de 3,9 vezes mais elevado que grupo controle. Em experimentos *in vitro*, um efeito agudo e dependente da dose, do composto **1**, na captação de cálcio em ilhotas pancreáticas, foi observado. O efeito estimulatório rápido da acilhidrazona **1** na captação de cálcio parece ser mediado, pelo menos em parte, pelos canais K^+ -ATP, pois este efeito foi semelhante ao observado para a glibenclâmida, mas não foi potencializado por esta sulfonilureia. Foi verificado que o cálcio extracelular e o cálcio dos estoques intracelulares estão envolvidos no efeito estimulatório da acilhidrazona **1**, o que pode contribuir para a secreção de insulina em células beta. O efeito insulínomimético foi evidenciado pela glicemia em ratos diabéticos induzidos por aloxano. A acilhidrazona **1** induziu um aumento significativo no conteúdo de glicogênio *in vivo* e a captação de glicose no músculo sóleo *in vitro*. Os resultados deste estudo indicam que acilhidrazona **1** atua sob dois alvos fisiológicos para a redução da glicemia: em ilhotas pancreáticas, atuando como um composto secretagogo de insulina, e em músculo esquelético, atuando como um composto insulínomimético.

Palavras - chaves: acilhidrazonas, glicemia, secretagogo, pâncreas, cálcio, insulínomimético, músculo esquelético. Parte inferior do formulário

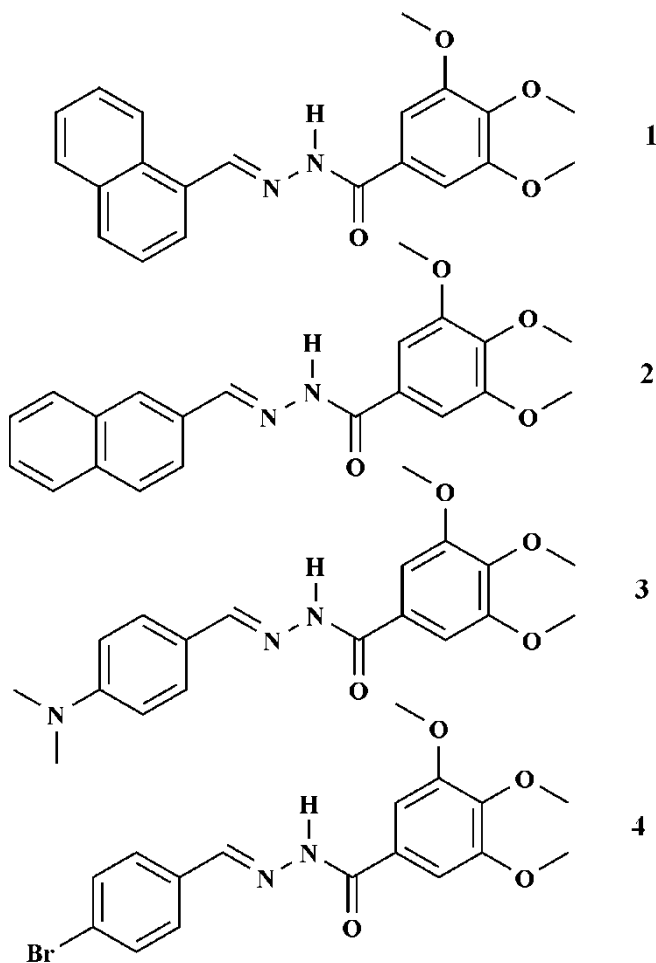
6.1 INTRODUÇÃO

O DM é um problema de saúde mundial e uma das principais causas de morbidade e mortalidade (WHO, 2013). A incidência da doença é elevada em todo o mundo e varia entre as populações, devido a diferenças genéticas, de suscetibilidade, bem como de outros fatores de risco modificáveis (HJELM, et al., 2003; QUASEEM et al., 2007). Enquanto a prevalência do DM alcançou proporções epidêmicas, os tratamentos disponíveis têm foco nos sintomas da doença, em vez de tratar a patologia. Existem basicamente dois tipos de diabetes, o DM1 e o DM2. O DM2 compreende a grande maioria dos casos de diabetes e é uma doença heterogênea marcada por disfunção das células beta (KAHN, 2003; RHODES, 2005) combinada com a resistência à insulina nos tecidos-alvo (YKI-JARVINEN, 1995; KAHN, 2003). A patogênese da doença envolve ambos os fatores genéticos e ambientais (SLADEK et al., 2007) e está frequentemente associada à obesidade (YKI-JARVINEN, 1995; ZIMMET, 1999; BAGGIO e DRUCKER, 2006). Por outro lado, o DM1 é caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas devido ao ataque autoimune mediado por células T (ATKINSON e EISENBARTH, 2001), o qual ainda não é completamente compreendido.

O DM1 e o DM2 têm em comum uma deficiência na massa de células beta. Embora as etiologias associadas com o DM1 e o DM2 sejam diferentes, ambas as formas estão caracterizadas por uma deficiência relativa na massa funcional de células beta de tal modo que as necessidades de insulina do corpo não são suficientes, e a glicemia se torna descontrolada (HANLEY, 2009). Assim, estudos que visam a investigar os mecanismos alvos da insulina a fim de melhorar os tratamentos para o diabetes, bem como melhorar a tolerância à glicose, seja através de uma melhoria da produção de secreção de insulina das células remanescentes (secreção de insulina), bem como melhorar a resposta à insulina nos tecidos alvo (sensibilizadores de insulina), ou substituindo a insulina em falta (compostos insulínomiméticos exógenos), são de grande importância no que concerne esta patologia.

As acilhidrazonas possuem um esqueleto estrutural semelhante às chalconas, compostos antidiabéticos previamente estudados (SEHATA et al., 1996; DAMAZIO et al., 2009; BORCHHARDT, et al., 2009). Elas apresentam um amplo espectro de propriedades biológicas, incluín-

do atividade analgésica, anti-inflamatória, antitrombótica, antinociceptiva e antiplaquetária (FRAGA et al., 2000; FRAGA e BARREIRO 2006). N-acilhidrazonas também produzem um efeito cardiovascular ionotrópico e vasodilatador do musculatura lisa vascular de ratos (SILVA et al., 2005). Recentemente, a relação estrutura atividade de 3,4,5-trimetoxi-hidrazonas foi descrita, mostrando uma potente atividade anticancerígena pela capacidade de provocar a despolimerização da tubulina (WANG et al., 2009; UFSC, 2011). Contudo, o efeito das acilhidrazonas no diabetes ainda não foi relatado. Estudos anteriores identificaram os substituintes em diferentes posições na estrutura do núcleo de chalconas que determinaram a atividade hipoglicemiante, bem como a especificidade da ação (ALBERTON et al., 2008; DAMAZIO et al., 2009; DAMAZIO et al., 2010). Levando em conta que o esqueleto estrutural das acilhidrazonas é semelhante ao das chalconas, algumas modificações foram selecionadas para a estrutura do núcleo das acilhidrazonas (Esquema 6.1).

Esquema 6.1. Estrutura das acilhidrazonas.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi determinar o papel das acilhidrazonas na redução da glicemia e no aumento da secreção de insulina, bem como o mecanismo de ação associada com a captação de cálcio em ilhotas pancreáticas. O efeito insulomimético da acilhidrazona **1** no músculo sóleo foi determinado por meio do conteúdo de glicogênio e ensaio de captação de glicose. Além disso, a toxicidade aguda das acilhidrazonas também foi investigada.

6.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

6.2.1 Materiais

Aloxano mono-hidratado, glibenclamida, diazoxida, nifedipina, (1 - [6 - [((17 β)-3-metoxiestra-1, 3,5)-trien-17-il) amino] hexil]-1H-pirrol-2 ,5-diona), U-73122 e glicogênio de ostra tipo II foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Os reagentes de iodo ($\text{CaCl}_2 + \text{I}_2 + \text{KI}$) foram adquiridos da VETEC, Rio de Janeiro, Brasil. O kit comercial utilizado para determinação da glicemia foi produzido por Analisa (Belo Horizonte, MG, Brasil). O ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) para a determinação quantitativa de insulina de rato (catálogo n.º EZRMI-13K) foi adquirido pela Millipore (St Charles, MO, EUA). $[^{45}\text{Ca}] \text{CaCl}_2$ (sp. ato. KBq 321/mg de Ca^{2+}), $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{-2-desoxi-D-glicose}$ ($[\text{C}^{14}]\text{-DG}$), atividade específica 10,6 GBq/mmol e líquido de cintilação biodegradável foram obtidos a partir de Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, EUA). Sais e solventes foram adquiridos da Merck® AG (Darmstadt, Alemanha).

Para os experimentos *in vivo* as acilhidrazonas foram dissolvidas em uma solução de Tween 80 a 0,3%; utilizada como veículo. Em todos os experimentos, o veículo por se não foi capaz foi capaz de alterar o resultado de qualquer das condições experimentais, para os grupos tratado e basal (dados não mostrados). Para os experimentos *in vitro*, as acilhidrazonas **1** e **4** foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO). Adicionou-se, DMSO em ambos, controles e tratamento em concentrações finais não superiores a 0,1% (v/v). A esta concentração, DMSO não afetou a função das ilhotas (LEBRUN et al., 1996).

6.2.2 Animais experimentais

Ratos *Wistar* albinos (180-210 g; 48-50 dias de idade) foram criados em um biotério setorial com ar condicionado (aproximadamente 21 ± 2 °C) e iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os ratos foram mantidos com ração peletizada (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil) e água de torneira ad libitum. Para tratamentos *in vivo* os

ratos foram privados de alimentos durante pelo menos 16 h, mas com o acesso livre à água. Todos os animais foram monitorados e mantidos de acordo com a lei Lei Arouca n.º 11.794/08 seguindo as recomendações éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA protocolo PP00414/UFSC).

6.2.3 Efeito das acilhidrazonas na curva de tolerância oral à glicose

Ratos hiperglicêmicos foram divididos em diferentes grupos de quatro animais (veja em Tabelas e Figuras), em controle e tratados. Grupos controle foram aleatoriamente divididos da seguinte forma: ratos que receberam veículo (solução de 0,3% de Tween 80) e ratos que receberam glicose (4 g/kg; 8,9 M), via oral por gavagem. Os ratos tratados, além da sobrecarga de glicose, receberam acilhidrazonas **1** (1, 10 e 100 mg/kg) e **2**, **3** e **4** (10 mg/kg), ou glibenclamida (10 mg/kg) via oral por gavagem. Os níveis de glicose no soro foram medidos imediatamente antes e aos 15, 30, 60 e 180 min após a sobrecarga de glicose. Após a centrifugação, as amostras de soro foram utilizadas para determinar os níveis de glicose, insulina e/ou atividade da lactato desidrogenase. A glicemia foi determinada pelo método da glicose oxidase (VARLEY, GOWENLOCK e BELL, 1976).

6.2.4 Ensaio de insulina sérica

A detecção da insulina foi pela aplicação do ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante. O intervalo de valores detectados pelo presente ensaio foi de 0,63 ng/mL a 4,3 ng/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra-e inter-ensaio para insulina foram 3,22 e 6,95 respectivamente, com uma sensibilidade de 0,2 ng/mL. Todos os níveis de insulina foram estimados por meio de medições colorimétricas a 450 nm com um leitor de placas de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, EUA), por interpolação a partir de uma curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como ng de insulina no soro mL⁻¹. As áreas incrementais nas curvas de resposta (AUC) foram calculadas. O índice insulínogênico (II) foi calculado como a razão entre o AUCinsulina e

AUCglicose (de zero a 60 min) e foi expresso em (ng/mg) (DAMAZIO et al., 2009).

6.2.5 Isolamento de ilhotas pancreaticas

O pâncreas do rato foi visualizado por meio de uma incisão central abdominal. O ducto biliar foi fixado na ponta do duodeno e canulado em um ponto suficientemente próximo ao fígado. O tampão Krebs Ringer bicarbonato (KRb) com uma composição de 122 mM de NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM de MgSO₄, 1,3 mM CaCl₂, 0,4 mM KH₂PO₄ 25 mM NaHCO₃ foi suplementado com 8 mM de HEPES (KRb-HEPES) o meio foi introduzido lentamente no ducto biliar por meio de seringa até o pâncreas se tornar claramente distendido. O pâncreas então foi removido cuidadosamente, mantido em uma placa de Petri com meio de KRb-HEPES. O tecido pancreático foi fatiado (2 x 2 mm) e incubado em tubos de plástico em 1 mL de meio KRb-HEPES suplementado com collagenase (3 mg). Após a incubação, a mistura foi transferida para um tubo conico e ressuspendido em 10 mL de meio KRb-HEPES isento de collagenase. Este foi centrifugado à temperatura ambiente durante 3 min a 45 x g em uma centrífuga Excelsa Baby (modelo 206), FANEM, São Paulo, SP, Brasil. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em meio de KRb-HEPES fresco. Este procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes, nas duas últimas lavagens as ilhotas foram deixadas decantar, sem centrifugação. Alíquotas (100 µL) do sedimento final com as ilhotas isoladas foram transferidas para tubos de Eppendorff com o meio de incubação KRb-HEPES (LACY e KOSTIANOVSKY, 1967; GRILLO et al., 2005).

6.2.6 Experimentos com captação de cálcio

As ilhotas isoladas foram pré-incubadas durante 60 min em um incubador metabólico Dubnoff para equilibrar a quantidade de cálcio intra e extracelular no tampão KRb-HEPES contendo 5 mM de glicose, 0,1 µCi/mL ⁴⁵Ca²⁺ + a 37°C, pH 7,4 e atmosfera gaseificada com O₂: CO₂ (95:5, v/v). As ilhotas foram incubadas durante 10 min em KRb-HEPES, sem (controle) ou com a acilhidrazona **1** (0,2; 2 e 20 µM). Em alguns experimentos os antagonistas de canais, agonistas ou inibidor da fosfolipase C (PLC) foram adicionados aos 45 min de incubação, cor-

respondendo a 15 min antes do tratamento e mantidos durante todo o período de incubação (ver legendas das figuras). Os fármacos utilizados foram: nifedipina (0,1; 1 e 10 μ M), diazoxida (250 μ M) (ZANATTA et al., 2011), glibenclamida (0,2; 2 e 20 μ M), U-73122 (1 μ M) (ZANATTA et al., 2011). O tempo de incubação com o tratamento foi de 10 min. A incubação foi interrompida utilizando a técnica descrita por BATRA e SJOGREN, (1983), com modificações (ZANATTA et al., 2011). Tampão frio (1 mL com cloreto de lantânio (10 mM) a 2°C, foi adicionado às amostras para bloquear os fluxos de cálcio. Os tubos foram centrifugados durante 1 min a 45 x g. O sobrenadante foi conservado e as ilhotas foram lavadas duas vezes em solução de cloreto de lantânio. As ilhotas foram adicionadas a tubos de eppendorfs contendo 300 μ L de solução de NaOH 0,5 M e fervidas a 100°C durante 5 min. Alíquotas de 50 μ L foram retiradas de cada amostra para a medição da radioatividade no líquido de cintilação Optiphase Hisafe III (Wallac Oy, Turku, Finlândia) em um espectrometro de cintilação líquida rack LKB beta (modelo LS 6500; multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, EUA), e alíquotas de 5 μ L foram utilizadas para a quantificação de proteína pelo método de LOWRY et al., (1951).

6.2.7 Efeito das acilhidrazonas na glicemia de ratos diabéticos

O diabetes foi induzido por uma injeção intravenosa única de 5% de mono-hidrato de aloxano em solução salina, em uma dose de 50 mg/kg de peso corporal. Amostras de sangue foram coletadas 3 dias depois e os níveis de glicose foram determinadas para confirmar o desenvolvimento do diabetes (DAMAZIO et al., 2009). Ratos diabéticos em jejum receberam a acilhidrazona **1** (10 mg / kg) por gavagem via oral. A glicose foi medida no soro antes e depois de 1, 2 e 3 h de tratamento.

6.2.8 Medidas de glicogênio muscular e hepático

Músculo sóleo e fígado foram removidos de ratos hiperglicêmicos, tratados e não tratados com o acilhidrazona **1** e **4** (10 mg/kg), e em seguida utilizados para o ensaio de conteúdo de glicogênio 3 h após a sobrecarga de glicose. Glicogênio foi realizado como descrito por KRISMAN, (1962), com pequenas modificações (CAZAROLLI et al.,

2012). Os tecidos foram pesados, homogeneizados em KOH 33% e fervidos a 100 °C durante 20 min, com agitação ocasional. Após o arrefecimento, etanol a 96% foi adicionado as amostras que foram aquecidas até à fervura seguida de um arrefecimento em banho de gelo para auxiliar a precipitação do glicogênio. Os homogeneizados foram centrifugados a 1300 x g durante 15 min; o sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi neutralizado com NH₄Cl saturado. Estes foram aquecidos a 100 °C durante 5 min, lavados e ressolubilizados em água. Conteúdo de glicogênio foi determinado por meio de tratamento com o reagente de iodo e a absorbância foi medida a 460 nm. Os resultados foram expressos como mg de glicogênio/ g de tecido.

6.2.9 Captação de glicose no músculo sóleo

Para os experimentos de captação de [U-¹⁴C]-2-desoxi-D-glicose, sóleo de ratos normais em jejum foram utilizados. Os músculos sóleo foram distribuídos (esquerdo e direito) entre grupos basais e tratados. Os músculos foram dissecados, pré-incubados durante 30 min e incubados por 60 min a 37 °C em tampão KRb suplementado com 3 mM de glicose, pH 7,4 e atmosfera de O₂/CO₂ (95%: 5%, v/v). A acilhidrazona **1** (20 μM) foi adicionada ao meio de incubação (60 min) na presença de ¹⁴C-DG (0,1 μCi/mL). Após a incubação, os músculos foram colocados em tubos de eppendorfs contendo 500 μL de uma solução de NaOH a 0,5 M e fervidos a 100 °C durante 5 min. Alíquotas de 25 μL foram retiradas das amostras para medições de radioatividade em líquido de cintilação Optiphase Hisafe III (Wallac Oy, Turku, Finlândia), em um espectrômetro de cintilação líquida LKB beta (modelo LS 6500, Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, EUA). Alíquotas de 5 μL foram utilizadas para a quantificação de proteína pelo método de LOWRY et al., (1951). Os resultados foram expressos como nmol de unidades de glicose/mg de proteína (CAZAROLLI et al., 2009), com modificações.

6.2.10 Ensaio da lactato desidrogenase

A toxicidade *in vivo* foi avaliada por medição da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase no soro depois de 3h e 30 min de tratamento com a acilhidrazona **1** e **4**. A atividade da LDH foi medida

aplicando método espectrofotométrico e o nível de atividade foi calculado pela medição da oxidação do NADH. Os resultados foram expressos como % do controle (HUTCHESSON et al., 1997).

6.2.11 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a Média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificado nas figuras. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “*p*” igual ou menor do que 0,05.

6.2.12 Síntese química

As acilhidrazonas foram preparadas pela condensação de 3,4,5-trimetoxibenzohidrazida e o aldeído apropriado, sob refluxo, (TROEBERG et al., 2000). O 3,4,5-trimetoxibenzohidrazida foi preparado como anteriormente descrito (CHIDA et al., 2001). Detalhes na síntese dos compostos foram anteriormente publicados (SEHATA et al., 1996; BORCHHARDT et al., 2009; UFSC, 2011).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Estudos do efeito das acilhidrazonas na curva de tolerância oral à glicose

O efeito das acilhidrazonas e da glibenclamida na glicemia em ratos hiperglicêmicos está mostrado na Figura 6.1 e na Tabela 6.1. Inicialmente, uma curva dose-resposta para a acilhidrazona **1** (1, 10 e 100 mg/kg), foi obtida. Como esperado, o grupo controle mostrou a glicemia aumentada após a sobrecarga de glicose quando comparado com o tempo zero do mesmo grupo. No entanto, a dose de 10 mg/kg da acilhidrazona reduziu a glicemia em 15, 30 e 60 min (28%, 22% e 19%, respectivamente) em comparação com o grupo controle hiperglicêmico. Como

pode ser visto na Figura 6.1, a glibenclamida, produziu um redução na glicemia após 15, 30 e 60 min, (23%, 32% e 32%), na dose de 10 mg/kg em comparação com o grupo hiperglicêmico controle, respectivamente. Esta dose de glibenclamida foi relatada por SAKAMOTO et al. (2006) e LEÓN-REYES, CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ e ORTIZ (2009), como sendo significativa para o controle glicêmico. Por outro lado, as doses de 1 e 100 mg/kg da acilhidrazona **1** ligeiramente reduziram a glicemia (aproximadamente 14% e 12%) apenas após 30 min, respectivamente (Figura 6.1). Com base nestes resultados, a dose de 10 mg/kg foi utilizada para estudos posteriores com as acilhidrazonas **2**, **3** e **4**.

Figura 6.1. Curva dose-resposta da acilhidrazona **1** adiministrada por gavagem na curva de tolerância oral à glicose. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico.

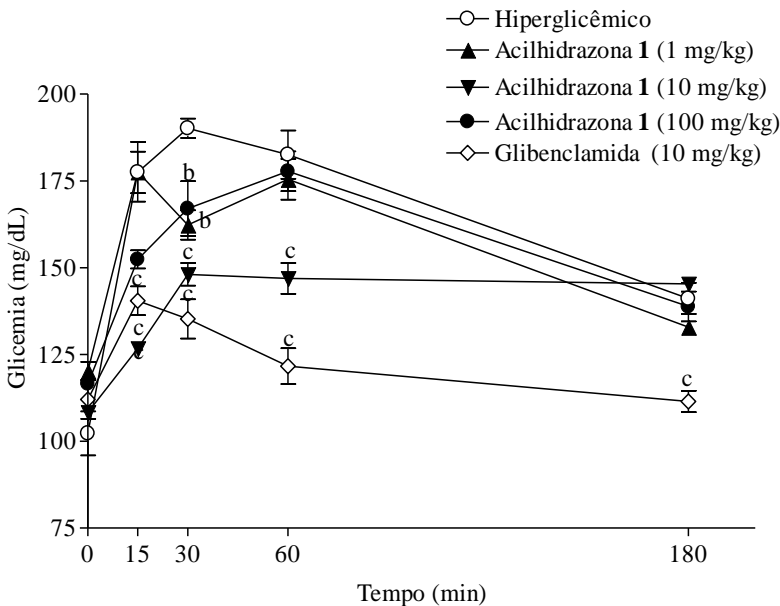


Tabela 6.1. Efeitos das acilhidrazonas **1**, **2**, **3** e **4** (10 mg/kg) na curva de tolerância oral à glicose. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações em triplicata. ^a $p \leq 0,05$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico.

	Níveis de glicose séricos (mg/dL) Tempo (min)				
	0	15	30	60	180
Hiperglicêmico	102,29 \pm 6,34	177,46 \pm 5,95	190,15 \pm 1,77	182,55 \pm 6,95	141,15 \pm 4,47
Glibenclamida	112,06 \pm 5,61	140,49 \pm 4,13 ^c	135,24 \pm 5,67 ^c	121,67 \pm 5,15 ^c	111,45 \pm 3,08 ^c
1	108,35 \pm 1,39	126,76 \pm 1,39 ^c	148,08 \pm 3,26 ^c	146,90 \pm 4,46 ^c	145,34 \pm 1,72
2	116,04 \pm 2,53	142,39 \pm 3,39 ^c	169,48 \pm 6,88 ^a	167,96 \pm 11,06	132,08 \pm 3,51
3	115,38 \pm 3,38	146,08 \pm 5,81 ^c	145,24 \pm 5,34 ^c	159,97 \pm 4,15	145,20 \pm 1,66
4	103,64 \pm 2,32	131,98 \pm 4,71 ^c	154,48 \pm 6,52 ^c	152,43 \pm 8,33 ^c	131,44 \pm 6,79

Com base nos resultados preliminares para a acilhidrazona **1** (substituinte 1-naftilo), foi testado o análogo estrutural **2** (substituinte 2-naftilo). Como pode ser observado na Tabela 1, o composto **2** diminuiu a glicemia aproximadamente 20% e 11% em 15 e 30 min, respectivamente, quando comparado com grupo controle hiperglicêmico. Estes dados indicam que a acilhidrazona **2** foi menos potente do que o composto **1**, devido a uma mudança na conformação do grupo naftilo. Além disso, foi analisada a influência de um grupo doador de elétrons no núcleo da acilhidrazona. A administração oral da acilhidrazona **3** (p-substituinte N (CH₃)₂) reduziu ligeiramente a glicemia em 18% e 23% aos 15 e 30 min respectivamente (Tabela 6.1). Por outro lado, a administração oral da acilhidrazona **4** com um grupo aceptor de elétrons (substituinte p-Br) mostrou significativa redução da glicemia, por volta de 25%, 18% e 16% aos 15, 30 e 60 min, respectivamente.

O primeiro objetivo foi demonstrar as melhores acilhidrazonas **1** e **4**, em reduzir significativamente a glicemia. Seguindo, os dois compostos selecionados foram utilizados para determinar o índice insulínogênico, com o respectivo mecanismo de ação e o efeito insulínomimético.

6.3.2 Efeito das acilhidrazonas nos níveis de insulina sérica

A Tabela 6.2 apresenta um padrão característico de secreção de insulina após sobrecarga de glicose (4 g/kg) no grupo controle hiperglicêmico, com um índice insulínogênico (II) de 0,66 ng/mg. As acilhidrazonas **1** e **4** apresentaram valores elevados do II cerca de 2,5 ng/mg. Além disso, a acilhidrazona **1** mostrou um efeito potente secretagogo de insulina dentro de 15 min após o tratamento oral. Como era de se esperar, a glibenclamida foi eficaz para induzir a secreção de insulina e exibe um II de cerca de 2 ng/mg. A via mais importante para a liberação de insulina a partir das ilhotas pancreáticas é regulada por íons de Ca²⁺ (MEYER, et al., 1999; BARG et al., 1999; RENSTROM et al., 2002; PROKS et al., 2002; GRIBBLE e REIMANN, 2003; BRYAN et al., 2005). Neste contexto, o mecanismo de ação da acilhidrazona **1** foi estudado na captação do cálcio em ilhotas pancreáticas.

Tabela 6.2. Efeitos das acilhidrazonas **1** e **4** (10 mg/kg) nos níveis de secreção de insulina. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações em triplicata. ^a $p \leq 0,05$; ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico.

Grupo	Níveis séricos de insulina (ng/mL) Tempo (min)				
	0	15	30	60	Π^*
Hiperglicêmico	$0,09 \pm 0,001$	$2,84 \pm 0,002$	$0,75 \pm 0,007$	$0,59 \pm 0,004$	0,66
Glibenclamida	-	$3,83 \pm 0,430^a$	$2,66 \pm 0,001^b$	$2,46 \pm 0,070^c$	1,98
1	-	$3,35 \pm 0,001^c$	$0,53 \pm 0,009$	$0,20 \pm 0,026$	2,55
4	-	$2,21 \pm 0,550$	$0,94 \pm 0,045$	$0,56 \pm 0,095$	2,53

*Índice insulinogênico (ng/mg).

6.3.3 Efeito da acilhidrazona na captação de Ca^{2+} em ilhotas pancreáticas

Após 60 min de incubação o equilíbrio de cálcio nas ilhotas pancreáticas é atingido com $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ($0,1 \mu\text{Ci/mL}$). As medições de cálcio foram realizadas em 10 min na presença da acilhidrazona **1** ou glibenclamida ($0,2$; 2 e $20 \mu\text{M}$). A Tabela 3 mostra que a concentração de $20 \mu\text{M}$ da acilhidrazona **1** mostrou um efeito estimulatório na captação de cálcio em torno de 3,0 vezes ($p \leq 0,001$) maior do que a observada para o grupo controle. A glibenclamida estimulou significativamente a captação de cálcio em $20 \mu\text{M}$. O aumento do cálcio intracelular nas células beta é essencial para exocitose de grânulos de insulina (RAJAN, et al., 1990; GILON et al., 2002; MATSCHINSKY, 2002). A captação de cálcio rápida e o tempo de incubação de 10 min para os experimentos *in vitro* estão relacionados à primeira fase da secreção da insulina em células beta (OLOFSSON et al., 2004; YANG e BERGGREN, 2005). Portanto, com base nesta curva dose-resposta, para os experimentos subsequentes, a concentração de $20 \mu\text{M}$ da acilhidrazona **1** e o período de incubação de 10 min foram utilizados.

Tabela 6.3. Curva dose-resposta da acilhidrazona **1** e da glibenclamida na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações em triplicata. ^b $p \leq 0,01$ e ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle.

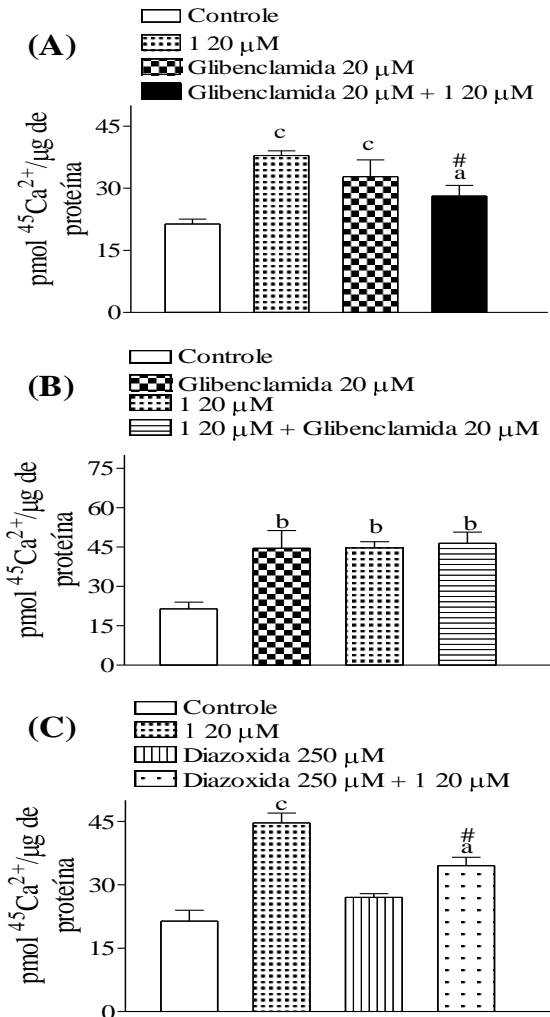
Grupo	Captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (% do controle)		
	$0,2 \mu\text{M}$	$2 \mu\text{M}$	$20 \mu\text{M}$
Glibenclamida	$132,14 \pm 7,58$	$134,79 \pm 7,51$	$156,72 \pm 9,67^b$
1	$136,50 \pm 4,24$	$138,96 \pm 5,61$	$301,05 \pm 2,86^c$

Nas células beta, o fechamento dos canais de potássio leva à despolarização da membrana de plasmática com posterior abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e aumento da captação de Ca^{2+} . Este aumento abrupto da concentração citosólica de Ca^{2+} livre é obrigatório para o desencadeamento da secreção de insulina (AGUILAR-BRYAN e BRYAN, 1999; ASHCROFT e GRIBBLE, 1999; SEINO et al., 2000; GILON et al., 2002). Assim, o mecanismo de ação da acilhidrazona **1** associado com o efeito estimulatório na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ foi investigada em ilhotas pancreáticas. Para avaliar o envolvimento de canais de potássio no efeito estimulatório da acilhidrazona **1** um agonis-

ta, a diazoxida (250 μM), e um antagonista, a glibenclamida (20 μM) dos canais de potássio, foram utilizados.

O composto **1** foi capaz de aumentar significativamente a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, cerca de 77% (Figura 6.2A). A glibenclamida, um bloqueador de canais K^{+} -ATP, estimulou a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 1,5 vezes maior que o controle. Por outro lado, quando a glibenclamida foi pré-incubada antes do composto **1**, uma diminuição significativa do efeito estimulatório da acilhidrazona **1** na captação de cálcio foi observada. Acredita-se que o composto **1** possa bloquear os canais K^{+} -ATP ou desestabilizar a ligação de glibenclamida no canal de potássio. As sulfonilureias são consideradas como antagonistas parciais dos canais K^{+} -ATP, pois o bloqueio do canal K^{+} -ATP pelas sulfonilureias, não é completo (PROKS et al., 2002). Além disso, a ligação máxima das sulfonilureias com o canal K^{+} -ATP é cerca de 60-80%, observada a partir da curva de inibição da concentração da sulfoniluréia (GRIBBLE, TUCKER e ASHCROFT 1997). Assim, testes foram realizados para verificar o efeito de uma incubação com o composto **1** após a glibenclamida. Como pode ser observado na Figura 6.2B, o efeito estimulatório do composto **1** na captação de cálcio foi exatamente o mesmo com ou sem glibenclamida. A partir destes resultados, é sugerido que o efeito estimulatório do composto **1** na captação de cálcio envolve a atividade do canal de potássio. Estes resultados foram corroborados pelo uso da diazoxida, um agonista dos canais de potássio, que foi capaz de diminuir (23%) a captação do cálcio induzida pela acilhidrazona **1** (Figura 6.2C). Estes resultados estão de acordo com a literatura (ANELLO, GILON e HENQUIN 1999; OLOFSSON et al., 2004), em que se demonstrou que a diazoxida diminui a eficácia do Ca^{2+} na exocitose da insulina. Os resultados sugerem que a participação dos canais de potássio desempenha um papel crucial no mecanismo de ação envolvidos no efeito estimulatório do cálcio pela acilhidrazona **1**.

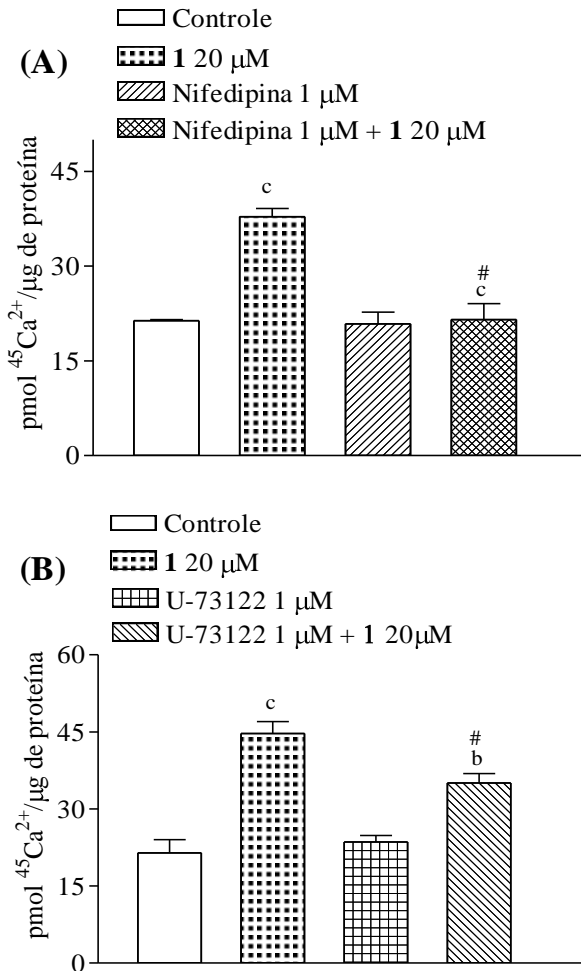
Figura 6.2. Envolvimento dos canais de K^+ -ATP no efeito estimulatório da acilhidrazona **1** na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. (A), Diazoxida 250 μM (B), glibenclamida 20 μM e (C), **1** 20 μM estavam presentes nos últimos 15 min do período de pré-incubação e durante o período de incubação. Tempo de pré-incubação: 60 min; tempo de incubação: 10 min. Média \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes. $^c p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle; $^{\#a} p \leq 0,05$ comparado com o grupo acilhidrazona **1**.



É bem conhecido que a despolarização da membrana plasmática induzida pelas sulfonilureias ativa os canais de cálcio tipo L, em ilhotas pancreáticas (PROKS et al., 2002; GRIBBLE e REIMANN, 2003; YANG e BERGGREN, 2006). Portanto, o envolvimento dos canais de cálcio tipo L e da fosfolipase C (PLC) foram investigados no efeito estimulatório da acilhidrazona **1** na captação de cálcio. A Figura 6.3A, mostra que a nifedipina 1 μM , após 15 min de incubação, não alterou o equilíbrio basal do cálcio (KAPPEL et al., 2013). No entanto, foi verificado que a nifedipina bloqueou a elevação rápida na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzida por acilhidrazona **1**.

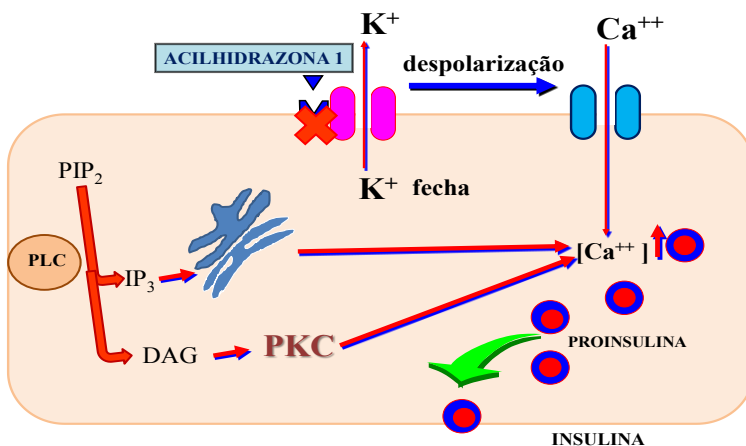
É importante notar que a captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ pode também ser produzida ou aumentada por mecanismos que são independentes da despolarização da membrana plasmática induzida pela atividade do canal K^+ -ATP (HENQUIN et al., 2003). A Figura 6.3B mostra que na presença de um inibidor da fosfolipase C (U-73122), o efeito estimulatório na captação de cálcio gerado pela acilhidrazona **1** foi parcialmente bloqueado. Além disso, outros estudos indicam que a PLC desempenha um papel significativo na manutenção da quantidade de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ intracelular, em particular, na segunda fase de secreção de insulina (YANG e BERGGREN, 2005; JING et al., 2005). Os resultados também sugerem a participação de cálcio a partir dos estoques no retículo endoplasmático no mecanismo de ação da acilhidrazona **1** em ilhotas pancreáticas. Estes resultados estão de acordo com a secreção de insulina *in vivo*, induzida pelo composto **1**, apresentado na Tabela 6.2.

Figura 6.3. Envolvimento dos canais de cálcio dependentes de voltage do tipo L e do cálcio dos estoques intracelulares na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas. (A), Nifedipina (1 μM) (B), U-73122 (1 μM) estavam presentes nos últimos 15 min do período de pré-incubação e durante o período de incubação. Tempo de pré-incubação: 60 min; tempo de incubação: 10 min. Média \pm S.E.M. de 3 experimentos independentes. $^c p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle; $^{\#c} p \leq 0,001$ e $^{\#b} p \leq 0,01$ comparado com o grupo acilhidrazona **1**.



A Figura 6.4 demonstra resumidamente os mecanismos em que a acilhidrazona **1** estimula a captação de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas.

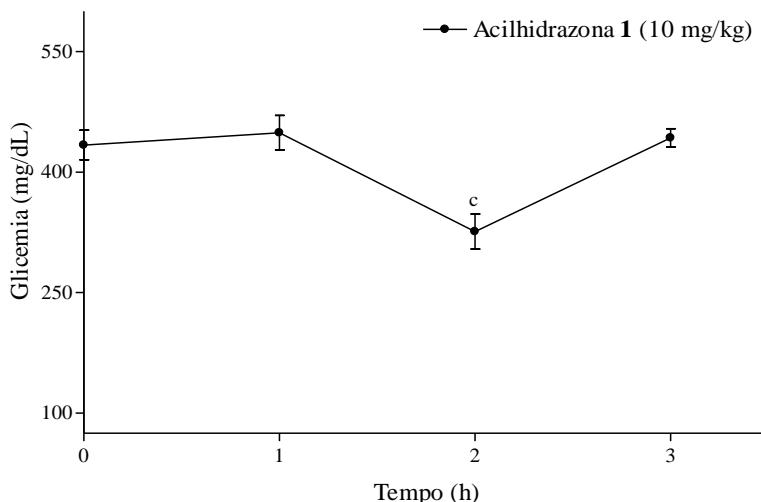
Figura 6.4. Modelo hipotético do mecanismo de ação da acilhidrazona **1** em células beta. Envolvimento dos canais de K^+ -ATP, dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e do cálcio dos estoques intracelulares. PLC: fosfolipase C, PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, IP₃: inositol 1,4,5-trifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína cinase C.



6.3.4 Estudo do efeito da acilhidrazona na glicemia em ratos diabéticos

O aloxano provoca uma destruição das células beta, por isso se torna uma abordagem útil para testar compostos com potencial efeito anti-diabético (FEDERIUK et al., 2004). A Figura 6.5 mostra uma redução significativa da glicemia aproximadamente 25% após 2 h de tratamento. Compostos com ação antidiabética podem regular os níveis de glicose por meio de aumento da captação de glicose, aumento do conteúdo de glicogênio e/ou inibição da captação da glicose intestinal, entre outros alvos específicos envolvidos no metabolismo de glicose (CAZAROLLI et al., 2008). Assim, a fim de investigar o papel insulinomimético da acilhidrazona **1**, o conteúdo de glicogênio muscular e hepático em ratos hiperglicêmicos foi analisado.

Figura 6.5. Efeito da acilhidrazona **1** na glicemia de ratos diabéticos induzidos por aloxano. Média \pm E.P.M., $n=6$. ^c $p \leq 0,001$ comparado com o tempo zero.



6.3.5 Efeito das acilhidrazonas no conteúdo de glicogênio

A Tabela 6.4 mostra que o tratamento agudo com a acilhidrazona **1** e **4** aumentou significativamente no conteúdo de glicogênio muscular aproximadamente 2,2 e 2,5 vezes maior que o controle, respectivamente. Por outro lado, estas acilhidrazonas não alteraram o conteúdo de glicogênio hepático. Estes resultados indicam que a acilhidrazona **1** atua diretamente no tecido periférico (músculo esquelético). Por esta razão, uma vez que o composto **1** aumentou o conteúdo de glicogênio no músculo esquelético e diminuiu a glicemia em ratos diabéticos, o efeito da acilhidrazona **1** na captação de glicose no músculo sóleo foi avaliada.

Tabela 6.4. Efeito das acilhidrazonas **1** e **4** (10 mg/kg) no conteúdo de glicogênio em ratos. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^c $p \leq 0,001$ comparado com o grupo controle hiperglicêmico. Resultados expressos em mg/g de tecido.

	Grupo		
	Hiperglicêmico	1	4
Músculo	7,72 \pm 0,40	16,81 \pm 0,61 ^c	18,76 \pm 2,16 ^c
Fígado	14,60 \pm 1,27	11,71 \pm 2,81	16,10 \pm 1,23

6.3.6 Efeito da acilhidrazona **1** na captação da glicose em músculo sóleo de ratos

A Tabela 6.5 mostra o efeito *in vitro* do acilhidrazona **1** (20 μ M) na captação de glicose no músculo sóleo de ratos após 60 min de incubação. Como pode ser observado, o composto **1** estimulou significativamente a captação ¹⁴C-DG quando comparado com o grupo de controle. De modo geral, em consideração aos dados aqui relatados (Figura 6.5, Tabela 6.4 e Tabela 6.5), a acilhidrazona **1** pode ser classificada como um agente insulinoimético. Similarmente, KAWABATA et al. (2011), relataram que chalconas preniladas com 4-hidroxiderricina xantangelol estimulam a captação de glicose em células L6 musculares, contribuindo para a homeostase da glicose.

Tabela 6.5. Efeito da acilhidrazona **1** 20 μ M na captação da glicose no músculo sóleo. Cada valor representa a média \pm E.P.M. de quatro determinações. ^b $p \leq 0,01$ comparado com o grupo controle.

Captação de glicose (nmol unidades glicose/mg de proteína)	
Controle	0,22 \pm 0,02
1	0,77 \pm 0,18 ^b

6.3.7 Efeito das acilhidrazonas na atividade da LDH

A toxicidade do tecido foi analisada por meio da atividade da LDH. O tratamento oral das acilhidrazonas **1** e **4** para 180 min não foi capaz de induzir danos ao tecido, como pode ser observado na Tabela 6.6. Além disso, TIAN et al. (2011) obteve nível baixo de citotoxicidade em acilhidrazonas em um intervalo de concentração semelhante.

Tabela 6.6. Efeito da acilhidrazona **1** e **4** (10 mg/kg) na atividade da LDH extracelular. Cada valor representa a média \pm E.P. M. de quatro determinações.

Grupo	LDH % do Controle Tempo (180 min)
1	115,2 \pm 11,9
4	116,6 \pm 5,8

6.4 CONCLUSÃO

O estudo dos efeitos *in vivo* e *in vitro* da acilhidrazona **1** possui pelo menos dois alvos estratégicos envolvidos na homeostase da glicose; o pâncreas e o músculo esquelético. Os efeitos da acilhidrazona **1** na glicemia, na secreção de insulina, e a ação estimulatória na captação de cálcio em ilhotas pancreáticas, sugerem fortemente papel secretagogo de insulina (Figura 6.4). O efeito antidiabético em ratos induzidos por alo-xano, o aumento no conteúdo de glicogênio muscular e na captação da glicose; sugerem um papel insulínomimético. Ainda, este composto não apresentou citotoxicidade. Finalmente, a acilhidrazona **1** parece representar um candidato potencialmente útil para a terapia de diabetes em um futuro próximo.

**7. MECANISMO DE AÇÃO DO ÁCIDO (2E)-N'-(1'-
NAFTIL)-3,4,5-TRIMETHOXIBENZOHIDRAZIDA NA
CAPTAÇÃO DE GLICOSE NO MÚSCULO ESQUELÉ-
TICO**

ARTIGO SUBMETIDO

Periódico: Drug Design, Development and Therapy

FREDERICO MJS; MASCARELLO A; CASTRO AJG; DA LUZ G;
ALTENHOFEN D; MENDES CP; LEAL PC; YUNES RA; NUNES
RJ; SILVA FRMB.

Mecanismo de ação do ácido (2E)-N'-(1'-naftil) -3,4,5-trimethoxibenzohidrazida na captação de glicose no músculo esquelético

Marisa Jádna Silva Frederico¹; Alessandra Mascarello²; Allisson Jhonatan Gomes Castro¹; Gabrielle Da Luz¹; Delsi Altenhofen¹; Camila Pires Mendes¹; Paulo Cesar Leal²; Rosendo Augusto Yunes²; Ricardo José Nunes²; Fátima Regina Mena Barreto Silva^{1*}

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Campus Universitário, Bairro Trindade, Cx. Postal 5069, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

²Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Campus Universitário, Bairro Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Resumo

O trabalho caracteriza o mecanismo de ação do ácido (2E)-N-(1'-naftil) - 3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (BZD) na captação de glicose em músculo esquelético e o efeito *in vivo* na homeostasia da glicose. O efeito agudo do BZD na captação de glicose foi mediado pelo aumento da expressão e da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática no músculo esquelético. O efeito genômico, bem como a translocação do GLUT4 envolveu a ativação da PI 3-K e da MAPK. Ainda, a integridade de microtúbulos para o processo de adesão e ancoramento das vesículas contendo GLUT4 foi crucial para o efeito estimulatório do BZD na captação da glicose. Além disso, o BZD reduziu a atividade das dissacaridases intestinais, um efeito adicional na homeostasia da glicose que reforça o potencial terapêutico deste composto para o tratamento do diabetes.

Palavras-chaves: (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida; captação de glicose; diabetes.

7.1 INTRODUÇÃO

O DM é um problema de saúde mundial, que afeta aproximadamente 5% população mundial. Projeções globais sugerem que mais de 552 milhões de pessoas terão diagnóstico de diabetes até o ano de 2030. Noventa e cinco por cento dos pacientes diabéticos são diagnosticadas com DM2 (WHITING et al., 2011). Atualmente existem alvos moleculares diferentes para o tratamento do DM2 que podem contribuir para a redução da hiperglicemia. O aumento da captação da glicose pelos transportadores de glicose (GLUTs) no músculo esquelético e no tecido adiposo é classificado como um alvo importante para a terapia do DM (MORGAN, CHAI e ALBISTON 2011). Entre a família de GLUTs, o GLUT4 exerce uma função primordial na captação de glicose em músculo esquelético (SILVA et al., 2013).

O efeito estimulatório da insulina na captação de glicose pelos tecidos periféricos implica na ativação de vias de sinalização intracelular que, culminam na translocação de GLUT4. Proteínas alvo, como a PI3-K, a Akt e as isoformas atípicas de aPKC (ζ e λ) são essenciais para o mecanismo de captação de glicose (FARESE e SAJAN 2010; NOZAKI et al., 2013). Além disso, outras vias de sinalização alternativas podem ser ativadas para estimular a captação de glicose. Esta via alternativa envolve a fosforilação do protooncogene Cbl (LIU et al., 2002) ou a ativação de proteína cinase ativada pelo 5'-AMP (AMPK) (HAYASHI et al., 1998; MU et al., 2001). Independentemente do estímulo, a inserção de GLUT4 para a membrana plasmática ocorre através de um processo de múltiplos passos que envolvem a redistribuição de vesículas para a periferia da célula, o ancoramento e a fusão com a membrana plasmática. Além disso, os filamentos de actina e os microtúbulos participam no processo de translocação de GLUTs (EYSTER e OLSON 2009; BOGAN, 2012).

O intestino é um tecido importante para a regulação da homeostase da glicose, pois pode regular a entrada de glicose exógena. Deste modo, a redução da absorção intestinal de glicose é outro alvo que podem contribuir para redução da hiperglicemia. Os inibidores da α -glicosidase, tais como acarbose ou miglitol são geralmente indicados para o tratamento do DM2 (DEROSA e MAFFIOLI 2010). Tratamentos *in vitro* e *in vivo* de compostos naturais, sintéticos e semi-sintéticos demonstraram inibir a absorção de glicose intestinal (YEE e FONG,

1996; PEREIRA et al., 2011; FREDERICO et al., 2013). Neste sentido, compostos que possam atuar em diferentes tecidos para reduzir a hiperglicemia são de interesse científico e clínico.

Derivados das acilhidrazonas ou benzohidrazidas são extensivamente estudados como compostos anti-inflamatórios, antinociceptivos, antiplaquetários e potentes vasoativos (FRAGA et al., 2000; SILVA et al., 2005; FRAGA e BARREIRO et al., 2006). Além disso, as benzohidrazidas são propostas como potenciais agentes terapêuticos para o DM, atuando como um secretagogo de insulina, e estimulando a captação de glicose em músculo esquelético (FREDERICO et al., 2012). No entanto, os múltiplos sítios de ação da acilhidrazona **1** ou do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (BZD) assim como o mecanismo de captação de glicose são desconhecidos. Neste trabalho, foi estudado o efeito agudo do BZD em tecidos estratégicos da homeostase da glicose e o mecanismo de ação deste composto na captação de glicose no músculo sóleo.

7.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

7.2.1 Materiais

HNMPA (AM)3 (inibidor da atividade tirosina cinase do receptor de insulina), foi adquirido a partir de Life Sciences Enzo® (NY, USA). A wortmanina (inibidor da PI3 - K), a colchicina (agente de despolimerização de microtúbulos), o RO 31-8220 (inibidor da PKC), o PMA (forbol-12-miristato-13- acetato), o PD98059 (2-(2-amino-3-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona, inibidor da MEK), o SB239063 (um inibidor de p38 MAPK), a cicloheximida (inibidor de síntese proteína), e a albumina de soro bovino (BSA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A Maltose D(+)- monohidratada foi adquirida da VETEC, Rio de Janeiro, Brasil. O ácido maleico foi adquirido a partir de Nuclear (Diadema, São Paulo, Brasil), e o kit glicose foi adquirida da Analisa (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). A [U-¹⁴C]-2-desoxi-D-glicose ([¹⁴C]-DG), atividade específica de 10,6 GBq/mmol; a timidina ([metil-¹⁴C]), atividade específica de 1,7464 GBq /mmol, a l-[U-¹⁴C] leucina, atividade específica de 11,4 GBq/mmol ([U¹⁴C] leucina) e líquido de cintilação biodegradável foram obtidos de Perkin Elmer

Life and Analytical Sciences, (Boston, MA, EUA). Anticorpo anti-rato conjugado com Cy3 foi adquirido a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Anticorpo anti-GLUT4 (SC-53566), foi obtido a partir da Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA). Os sais e os solventes foram adquiridos a partir de Merck®AG (Darmstadt, Alemanha). Reagente Fluor Save foi adquirido de Calbiochem (La Jolla, CA). O ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida foi obtido como descrito anteriormente (SEHATA et al., 1996).

Para os experimentos *in vivo* o BZD foi dissolvido em uma solução de Tween 80 a 0,3%; utilizada como veículo. Em todos os experimentos, o veículo per se não foi capaz de alterar o resultado de qualquer das condições experimentais, para os grupos tratado e basal (dados não mostrados). Para os experimentos *in vitro*, o BZD foi dissolvido em DMSO. O DMSO foi adicionado nos grupos controle e tratamento em concentrações finais não superiores a 0,1% (v/v).

7.2.2 Animais experimentais

Ratos *Wistar* albinos (180-210 g; 48-50 dias de idade) foram criados em um biotério setorial com ar condicionado (aproximadamente 21 ± 2 °C) e iluminação controlada (luzes acesas 6:00-18:00 h). Os ratos foram mantidos com ração peletizada (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil) e água de torneira ad libitum. Para tratamentos *in vivo* os ratos foram privados de alimentos durante pelo menos 16 h, mas com o acesso livre à água. Todos os animais foram monitorados e mantidos de acordo com a lei Lei Arouca n.º 11.794/08 seguindo as recomendações éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA protocolo PP00414/UFSC).

7.2.3 Captação de glicose no músculo sóleo

Para os experimentos de captação de $[U-^{14}C]$ -2-desoxi-D-glicose, músculo sóleo de ratos normais em jejum foram utilizados. Músculos sóleo foram distribuídos (esquerda e direita alternadamente) entre grupos controle e tratados. Os músculos foram dissecados, pré-incubados durante 30 min e incubados por 60 min a 37 °C em tampão KRb suplementado com 3 mM de glicose, pH 7,4 e atmosfera de O₂/CO₂ (95%:

5%, v/v). Primeiro, o BZD (0,2 μ M, 2 μ M ou 20 μ M) foi adicionado ao meio de incubação contendo 14 C-DG (0,1 μ Ci/mL) durante 60 min, para se obter a curva dose resposta. Depois, diferentes fármacos, tais como 100 μ M HNMPA(AM)3, 50 μ M PD98059, 10 μ M SB239063, 350 μ M cicloheximida, 100 nM wortmanina, 1 μ M colchicina, 1 μ M RO-318220 e 100 nM forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) foram adicionados no meio de pré-incubação (30 min) e incubação (60 min), na presença ou ausência do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida 20 μ M com 14 C-DG (0,1 μ Ci/mL). As amostras foram processadas de acordo com FREDERICO et al., (2012). Os resultados foram expressos em nmol de unidades de glicose/mg de proteína.

7.2.4 Estudos da síntese de proteína e da incorporação de timidina no DNA em músculo sóleo

Para os ensaios de síntese de proteínas, músculos sóleo foram removidos e pré-incubados durante 30 min em tampão KRb com O₂/CO₂ (95:5;v/v) pH 7,4. O BZD 20 μ M foi adicionado ao meio de incubação (60 min), na presença de l-[U- 14 C] leucina (0,1 μ Ci/mL). As amostras foram processadas como descrito por MENEGAZ et al., (2006). Os resultados da síntese de proteína foram expressos como CPM/ μ g de proteína.

Para o [metil- 14 C]-timidina em DNA, fatias de músculo foram distribuídas (alternadamente à esquerda e à direita) entre os grupos controle e tratados. Músculo sóleo foram removidos e pré-incubados durante 30 min em tampão KRb com O₂/CO₂ (95:5;v/v) pH 7,4. O BZD 20 μ M foi adicionada ao meio de incubação (60 min), na presença de 14 C-timidina (0,5 μ Ci/mL). Após a incubação, os músculos foram lavados em meio KRb frio e processados de acordo com ZANATTA et al., (2011). Os resultados foram expressos como CPM/ μ g de proteína.

7.2.5 Gel de poliacrilamida para eletroforese e análise de imunotransferência

Os músculos sóleo de ratos tratados *in vitro* com/sem 20 μ M BZD foram homogeneizados numa solução de lise contendo 2 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% (w/v) e a proteína total foi determinada (KAPPEL et al., 2013). Para a análise de eletroforese (homogenei-

zado inteiro), as amostras foram dissolvidas em 25% (v/v) de uma solução contendo 40% de glicerol, 5% de mercaptoetanol, 50 mM Tris-HCl, a pH 6,8 e fervido durante 3 min. As concentrações proteicas iguais foram carregadas em géis de poliacrilamida 12% e analisadas por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontínuo de Laemmli, (1970) e transferidas para membranas de nitrocelulose durante 2h a 120V em tampão de transferência (Trizma 48 mM, 39 mM de glicina, 20 % de metanol e 0,25 % de SDS). As membranas de nitrocelulose foram incubadas durante 2 h em solução de bloqueio (TBS, 0,5 M de NaCl, de Trizma 20 mM, mais 5% de leite em pó desnatado) e, em seguida, incubadas durante a noite a 4°C com anti-GLUT4 (1:500). As membranas foram incubadas durante 2 h com anticorpo anti-camundongo IgG (1:1000) e as bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando o kit de quimioluminescência do substrato de HRP Immobilon™ Ocidental (KAPPEL et al., 2013). Autorradiogramas foram quantificados através da determinação das densidades ópticas com 02.00 software (Packard Instrument Company) versão OptiQuant.

7.2.6 Análise por imunofluorescência

Músculos sóleos do tratamento *in vivo* com BZD 10 mg/kg (retirados após 180 min de tratamento por via oral) e do tratamento *in vitro* com/sem BZD 20 µM (105 min de incubação) foram fixadas em paraformaldeído a 4% , desidratadas e embebidas em parafina como DOS SANTOS et al., (2012). Resumidamente, blocos representativos dos tecidos embebidos em parafina foram cortados em 5 µm, desparafinizados, reidratados e colocados em 10 mM tampão citrato durante 8 min a 37 °C para recuperação antigênica. As secções foram submetidas a uma solução de bloqueio de BSA a 3% e 1% de Igepal em PBS durante 1h a 37°C e incubadas durante a noite a 7°C, com anticorpo anti- GLUT4 (1:500) na mesma solução. Após as lavagens, as secções foram incubadas durante 1h a 37°C com anticorpo conjugado com Cy3 (1:500) na mesma solução e, em seguida, contrastadas com DAPI. Assim, as secções foram montadas em *FluorSave*. Análises de distribuição de GLUT4 no tecido foram qualitativas (adaptado a partir de BARROS et al., 2006).

7.2.7 Ensaios da atividade das dissacarídes

Um segmento do intestino delgado foi removido, lavado em solução de NaCl a 0,9%, secados em papel de filtro, pesados, cortados e homogeneizados 6 x g com NaCl a 0,9% (400 mg de duodeno por mililitro) durante 1 min a 4°C. O extrato resultante foi centrifugado a 4722 x g durante 8 min. O sobrenadante foi utilizado para a medição da atividade *in vitro* e *in vivo*, da maltase e sacarase e também para a determinação da proteína. As atividades da maltase (CE 3.2.1.20) e sacarase (CE 3.2.1.48) foram determinadas utilizando um kit de diagnóstico de glicose baseado no reagente de glicose oxidase e de acordo com PEREIRA et al., (2011). A atividade específica foi definida como a atividade da enzima por miligrama de proteína. A concentração da proteína foi determinada como descrito por LOWRY et al., (1951), usando albumina sérica bovina como padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos, juntamente com os controles apropriados.

7.2.8 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a Média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificado nas figuras. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA), seguidas pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Mecanismo de ação do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na captação de glicose no músculo sóleo de ratos

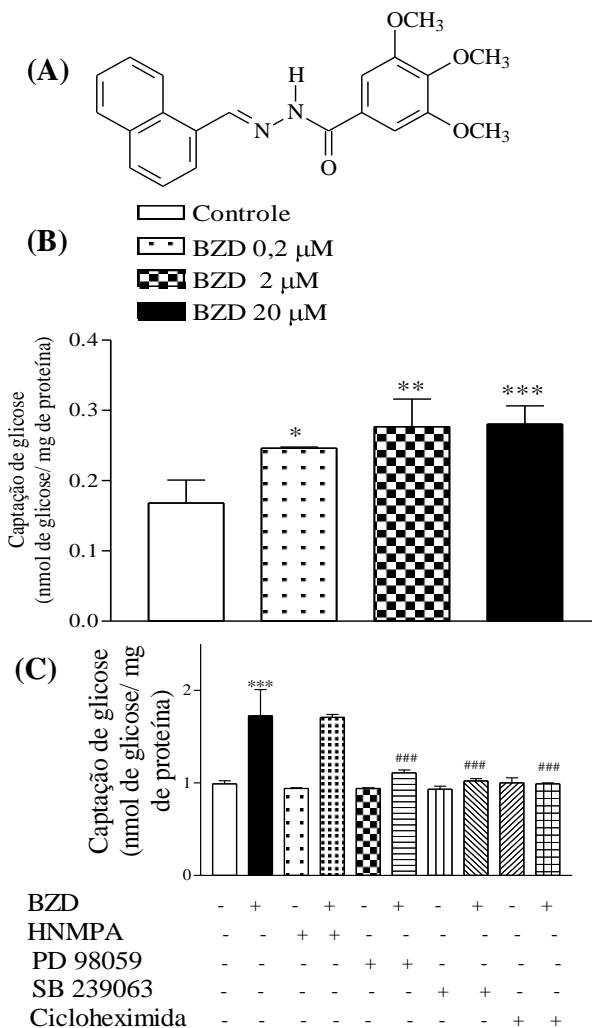
O efeito agudo do BZD (Figura 7.1A) na glicemia foi relatado anteriormente por FREDERICO et al. (2012) demonstrando uma redução significativa da glicemia na curva de tolerância oral à glicose. A Figura 7.1B mostra o efeito *in vitro* de diferentes concentrações (0,2; 2 ou 20

μM) do BZD na captação de glicose no músculo sóleo, em 60 min de incubação. Como pode ser observado, este composto estimulou a captação de ^{14}C -DG aproximadamente 80% para cada concentração, quando comparado com o grupo controle. Com base nestes resultados o mecanismo do BZD foi investigado.

Inicialmente, a captação de glicose foi medida com/sem 100 μM HNMPA(AM)₃, um inibidor da atividade tirosina-cinase do receptor de insulina (CAZAROLLI et al., 2013). O BZD 20 μM aumentou significativamente a captação de glicose quando comparada com o grupo de controle. O HNMPA(AM)₃, não alterou o efeito estimulatório na captação de glicose induzido pelo BZD.

Para avaliar o envolvimento as vias da MAP cinase sob efeito estimulatório do BZD, 50 μM de PD98059, um inibidor de MEK foi utilizado (CAZAROLLI et al., 2013). Na Figura 7.1C, o efeito estimulatório do BZD foi completamente bloqueado por PD98059. Além disso, o efeito estimulatório do BZD foi abolido na presença de 10 μM SB239063, um inibidor de p38 MAPK (CAZAROLLI et al., 2013). Deste modo, para avaliar se a resposta biológica do BZD é mediada por processo ativo de síntese proteínas de novo, a cicloheximida, um potente inibidor de síntese de proteínas (350 μM) foi utilizada (CAZAROLLI et al., 2013). A cicloheximida aboliu completamente o efeito estimulatório do presente composto na captação de glicose (Figura 7.1C).

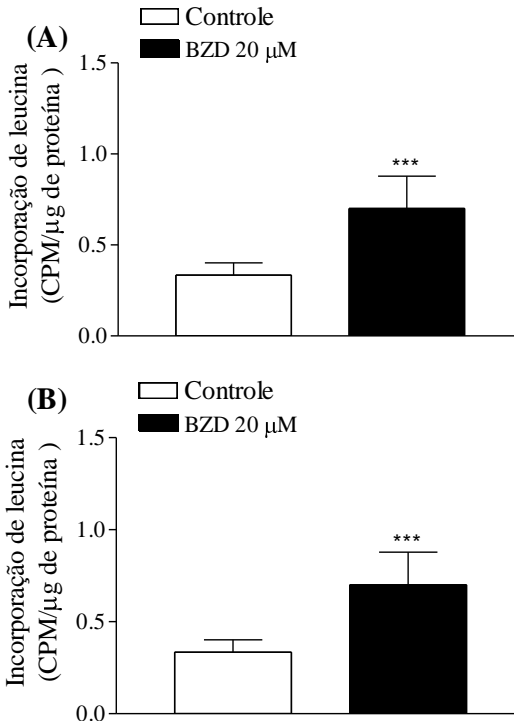
Figura 7.1. (A), Estrutura do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (BZD). (B), curva de dose-resposta do BZD. (C), HNMPA, PD 98059, SB 39063 e cicloheximida no músculo sóleo. Os valores são expressos como média \pm SEM, $n = 4$ de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em comparação com o grupo controle ### $p \leq 0,001$ em comparação com o BZD.



7.3.2 Efeito do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na síntese de proteínas e atividade nuclear

A fim de confirmar o efeito genômico do BZD na captação de glicose, a síntese de proteínas e atividade nuclear foi estudada. Ensaios de síntese de proteínas foram realizados em fatias de músculos sóleo. A incorporação de 1-[U- ^{14}C] leucina em proteínas foi significativamente aumentada por BZD 20 μM após 60 min de incubação (Figura 7.2A). Além disso, este composto aumentou drasticamente a incorporação de ^{14}C -timidina ao DNA no músculo após 60 min de incubação quando comparado ao grupo controle (Figura 2B).

Figura 7.2. Efeito do BZD 20 μM na incorporação de (A) ^{14}C -leucina em proteínas e (B) de timidina em DNA ([metil- ^{14}C]), *in vitro* no músculo sóleo. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 4$ *** $p \leq 0,001$ em comparação com o grupo controle.



7.3.3 Efeito do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na translocação de GLUT4, imunoconteúdo e localização da membrana plasmática no músculo sóleo

Para determinar o mecanismo através do qual o BZD estimulou a captação de glicose no músculo, foi realizado o ensaio de captação de glicose com 100 nM de wortmanina, um inibidor específico para PI 3-K (CAZAROLLI et al., 2013), 1 μ M de colchicina, um agente de despolimerização de microtúbulos, 1 μ M de RO 31-8220, um bloqueador de proteína cinase C atípica (aPKC) e 100 nM de PMA, um ativador da PKC nova e convencional (c/nPKC) (CAZAROLLI et al., 2013). O efeito do BZD na captação de glicose foi completamente bloqueado na presença de wortmanina e de colchicina. No entanto, o efeito estimulatório do BZD na captação de glicose não foi alterado na presença de RO 31-8220. O efeito estimulatório do BZD na captação de glicose foi completamente abolido na presença de PMA, um ativador da n/cPKC (Figura 7.3).

Na Figura 7.4 o BZD 20 μ M aumentou significativamente o imunoconteúdo total de GLUT4 no músculo sóleo quando comparado com o grupo de controle, *in vitro* (105 min). Além disso, a localização de GLUT4 com/sem BZD *in vivo* e *in vitro*, foi investigado como mostrado na Figura 7.5 no painel A, B, C, D e E. O efeito do composto na imunolocalização de GLUT4 *in vitro* (painel C) e também após o tratamento *in vivo* (painel D) foi evidente, como observado na membrana de plasmática do músculo sóleo. A presença de GLUT4 na célula foi marcadamente aumentada pelo BZD (painel C e D), comparados com os respectivos grupos de controle.

A Figura 7.6 resume os principais mecanismos ativados pelo BZD na captação de glicose em músculo sóleo.

Figura 7.3. Efeito de 100 nM wortmanina, 1 µM de colchicina , 1 µM RO 31-8220 e 100 nM de PMA na captação de glicose estimulada pelo BZD no músculo sóleo. Os valores são expressos como média ± E.P.M., n = 4 de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ em comparação com controle ### $p \leq 0,001$ em comparação com BZD.

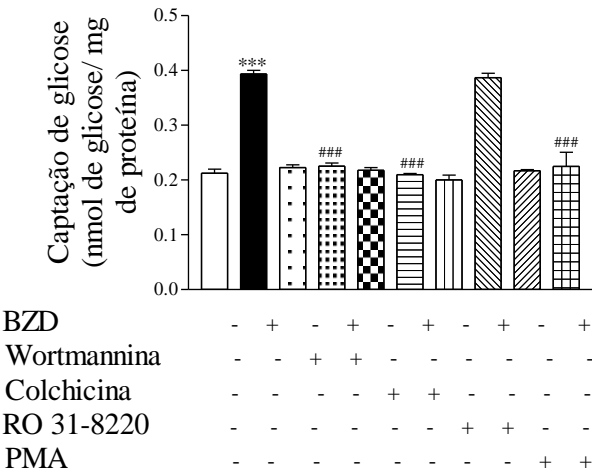


Figura 7.4. Efeito *in vitro* de 20 μ M do BZD no imunoconteúdo total de GLUT4 em músculo sóleo incubado por 60 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 4$ de 3 experimentos independentes. $p \leq 0,01$ em comparação com o grupo controle.

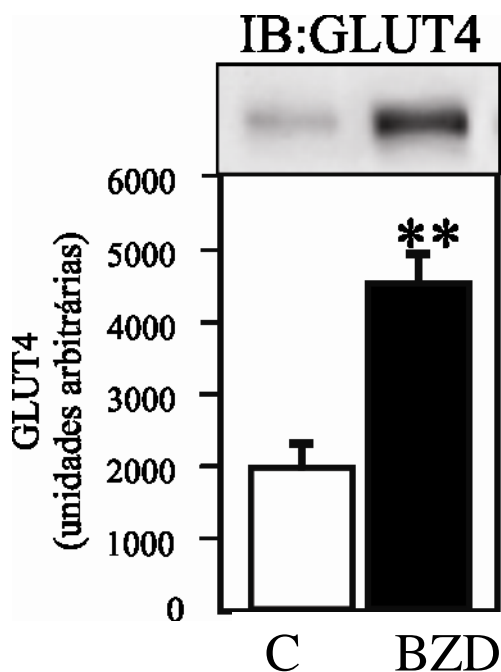


Figura 7.5. Efeito *in vitro* (20 μ M) e *in vivo* (10 mg/kg) do BZD na localização por fluorescência de GLUT4 no músculo sóleo. Para as análises *in vitro* (painel A e C), tempo de incubação: 60 min, na presença do BZD. Para as análises *in vivo* (painel B e D), em 210 min após administração oral do BZD. Painel E, lâmina de controle negativo no músculo sóleo.

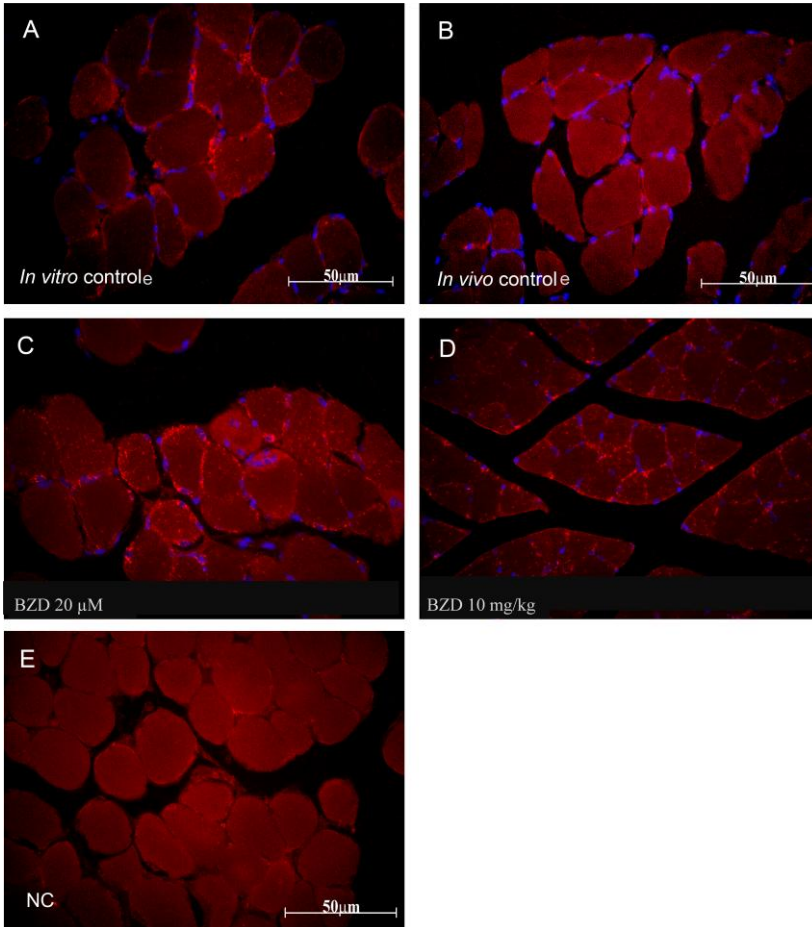
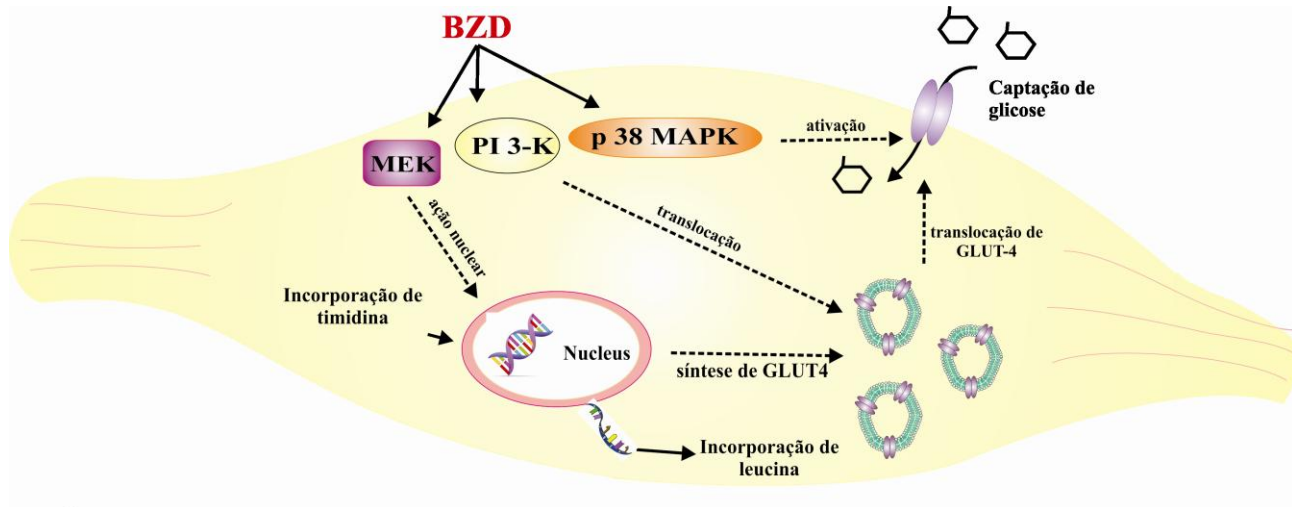


Figura 7.6. Modelo de captação de glicose estimulada pelo ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (BZD) no músculo esquelético. O BZD ativa uma variedade de vias de sinalização, tais como PI 3-K, p38 MAPK e MEK. Translocação de GLUT4 para a membrana do plasma dependente de PI 3-K. p38 MAPK estimula a atividade intrínseca do GLUT4. MEK aumenta atividade nuclear e a síntese de proteínas de novo, que culmina com o aumento da síntese de GLUT4. MEK: proteína cinase da cinase ativada por mitogéno seletiva para serina/treonina, PI 3-K: proteína cinase 3 fosfatidil-inositol, p38 MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno p 38, GLUT4: transportador de glicose 4.



7.3.4 Efeito do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na atividade das dissacaridases

O efeito do BZD foi avaliado após 210 min de tratamento *in vivo* (10 mg/kg) e *in vitro* (0,1; 1; 10 e 100 μ M) em 5 min de incubação. Este composto reduziu aproximadamente 22% e 27%, das atividades da sacarase e da maltase após o tratamento *in vivo* (Figura 7.7 A e B; respectivamente). Para o tratamento *in vitro*, o BZD não mostrou efeito inibitório na atividade da sacarase (Figura 7.8A). Por outro lado, a atividade *in vitro* da maltase foi reduzida cerca de 60% na presença do composto (Figura 7.8 B).

Figura 7.7. Efeito *in vivo* de 10 mg/kg do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na atividade específica de (A) sacarase e (B) maltase. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 5$ de 3 experimentos independentes. * $p \leq 0.5$ e ** $p \leq 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

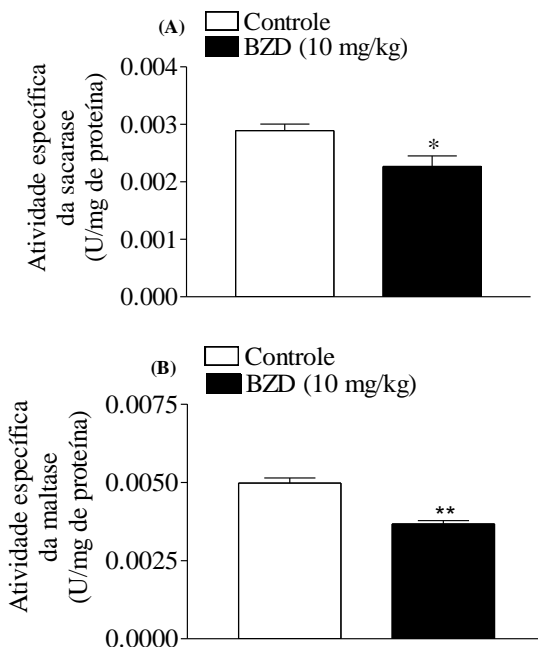
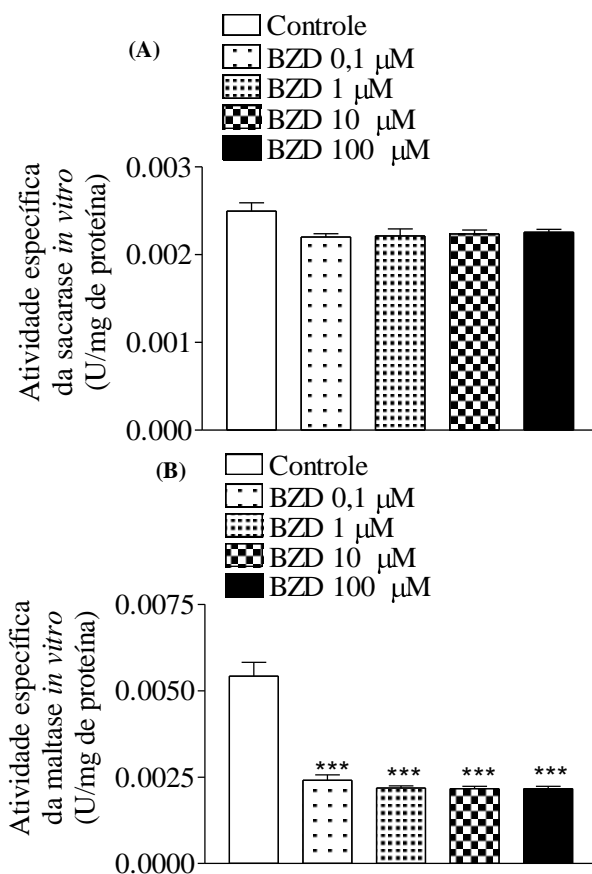


Figura 7.8. Efeito *in vitro* de diferentes concentrações do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida (0,1; 1; 10 e 100 μM) na atividade específica de (A) sacarase e (B) maltase. Os valores são expressos como média \pm E.P.M., $n = 5$ de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ quando comparado ao grupo controle.



7.4 DISCUSSÃO

Após a descoberta do efeito secretogogo de insulina e antihiper-glicêmico das acilhidrazonas ou benzohidrazidas relatados por FREDERICO et al. (2012), que também estão de acordo com as conclusões descritas por ZAPATA-SUDO et al. (2012), os atuais dados destacam o mecanismo de ação do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5-trimetoxibenzohidrazida na captação de glicose em um tecido-alvo da insulina, o músculo esquelético.

O efeito estimulatório do BZD na captação de glicose no músculo sóleo indica um efeito insulinomimético potente deste composto. O músculo esquelético é um dos principais alvos da insulina para manter o equilíbrio da glicose do corpo. A insulina aumenta a captação de glicose através da mobilização de vesículas contendo GLUT4 dos compartimentos intracelulares para a superfície celular (DOUEN et al., 1990; BOGAN, 2012). A captação de glicose também pode ser aumentada pelo músculo esquelético em resposta de contração (RUSSEL et al., 2004; DESHMUKH et al., 2006). Além do efeito da insulina no metabolismo da glicose e lipídeos, a ligação deste hormônio com o receptor desencadeia múltiplas vias de sinalização que participam no crescimento e diferenciação de células, que podem ser ativados através da via das MAPK (HEI, 1998). Embora a captação de glicose estimulada por BZD não foi modificado na presença de um inibidor da atividade tirosina-cinase do receptor da insulina, parece que este composto contribui para a captação de glicose ativando eventos genômicos. A inibição da MEK e da p38 MAPK com os inibidores PD98059 e SB239063 (UNDERWOOD et al., 2000; BARONE et al., 2001; JENSEN et al., 2003), respectivamente, indicam estes eventos. O envolvimento da MEK no transporte de glicose já foi descrito por alguns compostos naturais (CAZAROLLI et al., 2013; KAPPEL et al., 2013). A captação de glicose estimulada por BZD pode atuar através a via da MAPK, estimulando a expressão de transportadores de glicose ou de proteínas envolvidas em cascatas de fosforilação da insulina, uma vez que a captação de glicose foi completamente inibida na presença de cicloheximida. Estes resultados estão de acordo com o relatado por outros grupos (ANANDHARAJAN et al., 2006; CAZAROLLI et al., 2013; KAPPEL et al., 2013), sugerindo que a síntese de proteínas é importante para manter o transporte de glicose. Na Figura

7.2A e B, tanto a incorporação de leucina na síntese de proteínas, como a incorporação de timidina ao DNA foram estimuladas pelo BZD. Em conjunto, estes resultados indicam que o BZD pode exercer os efeitos biológicos através de efeitos nucleares.

A ativação sequencial da PI 3-K e da Akt após a ligação da insulina ao receptor de superfície celular é essencial para a translocação de GLUT4 (BOGAN, 2012). No presente estudo, se observou que a PI 3-K está fortemente envolvida no efeito estimulatório do BZD na captação de glicose, mesmo na presença do receptor de insulina inativado. A translocação de GLUT4 comumente requer a interseção das vias de sinalização da insulina e de tráfico de vesículas. O AS160, um substrato da Akt, pode mediar efeitos da insulina na maquinaria da translocação de vesículas contendo GLUT4 (GSV) (KANE et al., 2002; MIINEA et al., 2005; BOGAN, 2012). Além disso, foi observado que as GSVs se movem ao longo dos microtúbulos (SEMIZ et al., 2003; LIZUNOV et al., 2005). Estudos demonstram que os agentes despolimerizadores de microtúbulos inibem a translocação de GLUT4 e a captação de glicose estimulada por insulina (FLETCHER et al., 2000; OLSON et al., 2003). Além disso, esses autores mostraram que o transporte de vesículas contendo GLUT4 ao longo dos microtúbulos é indispensável para a translocação de GLUT4. O presente resultado indica que o aumento da captação de glicose por BZD requer microtúbulos intactos para a translocação de GLUT4 e este efeito pode ser dependente de PI 3-K. Estes eventos são semelhantes aos demonstrados para a translocação de GLUT4 em adipócitos por SEMIZ et al., (2003) e LIZUNOV et al. (2005).

Após a geração de fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato, este por sua vez, ativa a cinase 1 dependente de fosfatidil-inositol (PDK1). Esta cinase, em seguida, ativa a Akt e as isozimas PKC ζ e PKC ι/λ da aPKC (KANO et al., 2001). Estas isoenzimas da aPKCs desempenham função importante na ativação do transporte de glicose por insulina, em adipócitos 3T3-L1 (KANO et al., 2001) e em adipócitos de ratos e humanos (STANDAERT et al., 1997; BANDYOPADHYAY et al., 2002). Neste estudo, as c/nPKC, quando ativadas por PMA, bloquearam o efeito estimulatório de BZD na captação de glicose. Estes dados em conjunto indicam que esta via não está diretamente envolvida no efeito estimulatório do BZD na captação de glicose. Estes resultados estão de acordo com os descritos por CHEN et al., (2008) desde que PMA não estimula a captação de glicose em miotubos L6. Além disso, a ativação

de nPKCs também está envolvido no desenvolvimento da resistência à insulina (TIMMERS, SCHRAUWEN e DE VOGEL, 2006). Com base nos dados da Figura 7.3A, as isoformas de PKC não estão envolvidos no efeito estimulatório do BZD na captação de glicose, uma vez que o RO 31-8220, que foi capaz de bloquear as isoformas PKC atípicas (CAZAROLLI et al., 2013), não alterou o efeito estimulatório do BZD. Além disso, PMA, que é um ativador de c/nPKC, anulou a ação estimulatória do BZD na captação de glicose (KAPPEL et al., 2013). Em experimentos adicionais, se observou que o cálcio intra e extracelular não está envolvido no efeito estimulatório do BZD na captação de glicose (dados não mostrados).

O BZD pode atuar através da via MAPK para estimular a expressão de transportadores de glicose. Assim, o imunocontéudo, bem como a localização de GLUT4 na membrana plasmática de músculo sóleo, na presença do BZD foi aumentada significativamente quando comparada ao grupo controle. A Akt ativa fosforila vários efetores downstream que promovem diversas respostas biológicas, incluindo a estimulação da captação de glicose, síntese de proteínas e de glicogênio e a regulação da expressão gênica (BOGAN, 2012). A insulina ativa as vias MAPK, que podem estar envolvidas em efeitos mitogênicos em vez de metabólicos. O IRS-1 e uma molécula adaptadora Shc são responsáveis pela ativação de p21ras, via Grb2 e mSOS e que ativam a via das MAPK (BOGAN, 2012).

SWEENEY et al. (1999) sugere que a ativação da p38 MAPK pode mediar a captação de glicose estimulada por insulina. Além disso, foi proposto que o transporte de glicose estimulado por insulina pode incluir alterações na atividade intrínseca dos GLUTs (MOYERS et al., 1996). Foi demonstrado que os quatro inibidores da p38 MAPK reduzem a captação de glicose estimulada por insulina, sem alterar a translocação dos GLUTs (SWEENEY et al., 1999). No presente estudo, o efeito estimulatório do BZD foi completamente bloqueado por SB239063. Juntos, estes resultados sugerem uma correlação positiva entre a estimulação da captação de glicose e ativação de p38 MAPK.

O intestino exerce uma função importante para a homeostase da glicose. Uma abordagem terapêutica para reduzir a hiperglicemia pós-prandial é a de retardar a absorção de glicose através da inibição das enzimas de hidrólise de hidratos de carbono, tais como α -glicosidases, no intestino. Estas enzimas chamadas dissacarídeos estão localizadas

na membrana em forma de escova do intestino delgado e são necessárias para a decomposição de hidratos de carbono antes da absorção de monossacarídeos. Os inibidores da α -glicosidase retardam a absorção de carboidratos ingeridos, diminuindo os picos de glicemia e insulina pós-prandial (DE MELO e CARVALHO, 2006). Alguns estudos têm mostrado que a atividade da sacarase e da maltase se encontram anormalmente elevadas no intestino delgado de pacientes diabéticos e em modelos animais de diabetes (LIU et al., 2010; HAMDEN et al., 2011; DENG et al., 2011). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram evidências de que a deficiência de insulina induz o aumento anormal na expressão de dissacarídeos intestinais em estados diabéticos (LIU et al., 2011). Neste estudo, foi demonstrado que o BZD reduziu *in vivo* a atividade da sacarase e da maltase e *in vitro* na atividade da maltase. Desde modo este composto é capaz de controlar a homeostasia de um tecido importante envolvido no controle da glicemia.

7.5 CONCLUSÕES

O efeito estimulatório do ácido (2E)-N-(1'-naftil)-3,4,5 trimetoxibenzohidrazida na captação de glicose no músculo esquelético pode ocorrer como uma consequência da atividade intrínseca alterada de GLUT4 e do aumento de síntese de proteínas; através de um mecanismo mediado pela via da PI 3-K e da MAPK (Figura 7.6). Além disso, BZD contribui para o equilíbrio da glicose através da redução da atividade das dissacarídeses intestinais. Juntos, estes resultados apontam o BZD como um alvo potencial para as estratégias de intervenção farmacológica no controle da homeostase da glicose.

8. DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS

O presente trabalho avaliou duas classes estruturais de compostos, as sulfonamidas derivativas de um fragmento estrutural da glibenclamida e as acilhidrazonas. Dentro da particularidade de cada classe, ambas apresentaram efeitos biológicos sobre a homeostasia da glicose e em diferentes tecidos alvo da insulina.

A importância de se realizar um estudo em que se modifica a estrutura de um medicamento já conhecido e amplamente utilizado, a glibenclamida, em longo prazo é a possível utilização desta nova estrutura como novo tratamento para pacientes diabéticos. Apesar de a glibenclamida ser excelente para reduzir a glicemia e os diminuir níveis de hemoglobina glicada (HBA1c), ela possui graves efeitos colaterais, principalmente para o tratamento do diabetes, sendo estes, o ganho de peso, o risco da hipoglicemia e a exaustão e conseqüente perda da função da célula beta pancreática (RABUAZZO et al., 1992; BALL, FLATT e MCCLENAGHAN 2000; BALL et al., 2000).

O teste de tolerância oral à glicose realizado neste trabalho possui sensibilidade de aproximadamente 15% para detectar um impacto estatisticamente significativo dos compostos testados. Este protocolo é amplamente utilizado para o *screening* de compostos com potencial atividade antidiabética (MEDINA GOMEZ et al., 2005; CANI et al., 2006; ANDREELLI et al., 2006). Nos resultados relacionados a sulfonamida 5, esta reduziu a glicemia de maneira menos drástica quando comparada a glibenclamida. Este fato pode ser um indicativo de um menor risco de hipoglicemia em um tratamento crônico, por exemplo. O segundo aspecto notável da sulfonamida 5 é o perfil da secreção de insulina. O efeito da exaustão das células beta pancreáticas está relacionado a uma maior secreção de insulina de primeira fase (5 a 10 min) (YANG e BERGGREN, 2006). Apesar de nosso estudo ser limitado quanto a este aspecto, pois o avaliamos a secreção de insulina apenas em 15 min, o fato do efeito secretagogo da sulfonamida 5 ocorrer em 30 e 60 min, pode representar menor dano as células beta.

A sulfonamida 11 tem poder de redução de glicemia sobre a curva de tolerância oral a glicose muito semelhante à glibenclamida. Outro aspecto de semelhança com a glibenclamida é o poder em reduzir A-

GES, que clinicamente está relacionado à redução da HbA1c (LESLIE e COHEN, 2009). Além disso, este composto aumentou a captação da glicose em tecido muscular e adiposo, um efeito também já conhecido da glibenclamida (TSIANI et al., 1995). Contudo, ainda não foi avaliado o poder secretagogo da sulfonamida 11. A sulfonamida 11 pode apresentar vantagens ao uso da glibenclamida em estudos que visem à redução da dose para se obter o mesmo efeito terapêutico, um aspecto não avaliado em nosso estudo. Por isso, em uma análise inicial dos resultados obtidos com as sulfonamidas baseadas em um fragmento da glibenclamida é que mais estudos devem ser realizados no sentido de avaliar os possíveis efeitos adversos e caracterizar os efeitos biológicos de maneira a desvendar se estas novas estruturas podem se tornar medicamentos mais atraentes do que a glibenclamida ou outros medicamentos já disponíveis no mercado para tratamento do diabetes, em estudos pré-clínicos.

As acilhidrazonas apresentam um amplo espectro de ação, sendo consideradas como substâncias promíscuas, que podem agir em mais de um sítio de ação (FRAGA et al., 2000; SILVA et al., 2005; FRAGA e BARREIRO et al., 2006; WANG et al., 2009). A acilhidrazona **1** ou ou ácido [(2E)-N-(1'-naftil) -3,4,5-trimetoxibenzohidrazida] ou BZD parece compartilhar com estas características em relação a sua atividade sobre a homeostasia da glicose, pois nos resultados do presente trabalho, o BZD mostrou efeitos tanto na secreção como na ação da insulina. O BZD reduziu a glicemia sobre a curva de tolerância oral a glicose, aumentou a secreção de insulina, reduziu a glicemia em animais diabéticos e aumentou a captação de glicose no tecido muscular. Além destes efeitos, em estudos não demonstrados neste trabalho, o BZD aumentou os níveis de GLP-1 séricos sobre a curva de tolerância oral à glicose em ratos e reverteu a resistência a insulina e a esteatose hepática em camundongos swiss resistentes a insulina. Como podemos observar, este composto age sobre o metabolismo de carboidratos e lipídeos sugerindo muitas ações biológicas atraentes para a terapêutica do DM2. Neste sentido estudos pré-clínicos de toxicidade aguda e crônica, e testes farmacocinéticos e farmacodinâmicos podem ser realizados a fim de aprovar este composto para estudos em humanos.

9. CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos neste trabalho concluímos que as sulfonamidas baseadas em um fragmento da glibenclamida e as acilhidrazonas sintéticas possam regular a homeostasia da glicose. Os mecanismos envolvem o aumento na utilização da glicose pelos tecidos periféricos, o estímulo da secreção de insulina, a inibição da glicação e a inibição da enzima que permite a absorção intestinal da glicose. Estes resultados indicam que ambas as classes podem atuar em diferentes mecanismos de ação para regular a homeostasia da glicose e colaborar para a prevenção das complicações do diabetes. Estudos pré-clínicos adicionais como testes de prova de conceito para confirmação de um efeito translacional na terapia para o tratamento do diabetes devem ser realizados em um futuro próximo.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL AZIZ, A.H. et al. Nadolol-glibenclamide interaction: relevance to carbohydrate metabolism in hyperglycaemic rats. **Pharmacological Research**, v.34 p.11-15, 1996.
- AGUILAR-BRYAN, L. BRYAN, J. Molecular biology of adenosine triphosphate sensitive potassium channels. **Endocrine Reviews**, v.20 p.101-135, 1999.
- AGUILAR-BRYAN, L. et al. Cloning of the β -cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. **Science**, v.268 p.423-426, 1995.
- ALBERTON, E.H. et al. Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. **Chemico-Biological Interactions**, v.171 p.355-362, 2008.
- ANANDHARAJAN, R. et al. *In vitro* glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of GLUT4, PI3 cinase and PPAR γ in L6 myotubes. **Phytomedicine**, v.13 p.434-441, 2006.
- ANDREELLI F. et al. Liver adenosine monophosphate-activated kinase- α 2 catalytic subunit is a key target for the control of hepatic glucose production by adiponectin and leptin but not insulin. **Endocrinology**, v.147 p.2432-41, 2006.
- ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R. et al. Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44 p.755-763, 2009.
- ANELLO, M.; GILON, P.; HENQUIN, J.C. Alterations of insulin secretion from mouse islets treated with sulphonylureas: perturbations of Ca^{2+} regulation prevail over changes in insulin content. **British Journal of Pharmacology**, v.127 p.1883-1891, 1999.
- ARKHAMMAR, P. et al. Protein kinase C modulates the insulin secretory process by maintaining a proper function of the beta-cell voltage-activated Ca^{2+} channels. **The Journal of Biological Chemistry**, v.269 p.2743-2749, 1994.
- ASHCROFT, F.M.; GRIBBLE, F.M. ATP-sensitive K^{+} channels and insulin secretion: their role in health and disease. **Diabetologia**, v.42 p.903-919, 1999.

- ASHCROFT, F.M.; HARRISON, D.E.; ASHCROFT, S.J. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. **Nature**, v.312 p.446-448, 1984.
- ASHCROFT, F.M.; RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic β -cell. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.54 p.87-143, 1989.
- ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**, v.358 p.221-229, 2001.
- BACKER, J.M. et al. Phosphatidylinositol 3'-cinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **The EMBO Journal**, v.11 p.3469-3479, 1992.
- BAGGIO, L.L.; DRUCKER, D.J. Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. **Annual review of medicine**, v.57 p.265-281, 2006.
- BAK, J.F. et al. Postreceptor effects of sulfonylurea on skeletal muscle glycogen synthase activity in type II diabetic patients. **Diabetes**, v.38 p.1343-1350, 1989.
- BALL, A.J. et al. Drug-induced desensitization of insulinotropic actions of sulfonylureas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.29 p.234-239, 2000.
- BALL, A.J.; FLATT, P.R.; MCCLENAGHAN, N.H. Desensitization of sulphonylurea- and nutrient-induced insulin secretion following prolonged treatment with glibenclamide. **European Journal of Pharmacology**, v.24 p.327-333, 2000.
- BANDYOPADHYAY, G. et al. PKC-zeta mediates insulin effects on glucose transport in cultured preadipocyte-derived human adipocytes. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.87 p.716-723, 2002.
- BARG. S. et al. The stimulatory action of tolbutamide on Ca^{2+} -dependent exocytosis in pancreatic β cells is mediated by a 65-kDa mdr-like P-glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96 p.5539-5544, 1999.
- BARONE, F.C. et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia. **Medical Research Reviews**, v.21 p.129-145, 2001.

- BARROS, R.P.A. et al. GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103 p.1605-1608, 2006.
- BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Sciences**, v.32 p.315-319, 1983.
- BENES, C. et al. Mode of regulation of the extracellular signal-regulated cinases in the pancreatic beta-cell line MIN6 and their implication in the regulation of insulin gene transcription. **Biochemical Journal**, v.340 p.219-225, 1999.
- BERGMAN, R.N. New concepts in extracellular signaling for insulin action: the single gateway hypothesis. **Recent Progress Hormone Research**, v.52 p.359-385, 1997.
- BOGAN, J.S. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. **Annual Review of Biochemistry**, v.81 p.507-532, 2012.
- BORCHHARDT, D.M. et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as inhibitors of cruzain from trypanosoma cruzi. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21 p.142-150, 2010.
- BORRAS, J. et al. Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis of water-soluble, topically effective intraocular pressure lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing 8-quinoline-sulfonyl moieties: is the tail more important than the ring? **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.7 p.2397-2406, 1999.
- BRADY, M.J.; NAIRN, A.C.; SALTIEL, A.R. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272 p.29698-29703, 1997.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v.54 p.1615-25, 2005.
- BRYAN, J. et al. Insulin secretagogues, sulfonylurea receptors and K(ATP) channels. **Current Pharmaceutical Design**, v.11 p.2699-2716, 2005.

- BUTLER, A.E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.52 p.102-110, 2003.
- CANI, P.D. et al. Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. **Diabetes**, v.55 p.1484-1490, 2006.
- CAZAROLLI, L.H. et al. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8 p.1032-1038, 2008.
- CAZAROLLI, L.H. et al. Insulin signaling: a potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. **European Journal of Pharmacology**, v.712 p.1-7, 2013.
- CAZAROLLI, L.H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2"-O-alpha-L-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on ^{14}C -glucose uptake. **Chemico-Biological Interactions**, v.179 p.407-412, 2009.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; Ferrier, D.R. In: Introdução aos carboidratos. **Bioquímica Ilustrada**, Artmed Porto Alegre RS – 4 ed. 2010.
- CHANG, L.; CHIANG, S.H.; SALTIEL, A.R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. **Molecular Medicine**, v.10 p.65-71, 2004.
- CHEN, Y. et al. A pre-docking role for microtubules in insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation. **FEBS Journal**, v.275 p.705-712, 2008.
- CHIDA, A.S. et al. Synthesis of 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone: A key fragment in coenzyme-Q series. **Synthetic Communications**, v.31 p.657, 2001.
- CHUTKOW, W.A. et al. Disruption of Sur2-containing K^+ -ATP channels enhances insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98 p.11760-11764, 2001.
- CONTI, L.R. et al. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. **Journal of Biological Chemistry**, v.276 p.41270-41278, 2001.
- DAHLQVIST A. A method for the determination of amylase in intestinal content. **Scandinavian Journal**

- of **Clinical and Laboratory Investigation**, v.44 p.169-172, 1984.
- DAMAZIO, R.G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45 p.1332-1337, 2010.
- DAMAZIO, R.G. et al. Nitrochalcones: potential in vivo insulin secretagogues. **Biochimie**, v.91 p.1493-1498, 2009.
- DANIELS, E.L.; LEWIS, S.B. Acute tolbutamide administration alone or combined with insulin enhances glucose uptake in the perfused rat hindlimb. **Endocrinology**, v.110 p.1840-1842, 1982.
- DATTA, S.R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M.E. Cellular survival: a play in three Acts. **Genes Development**, v.13 p.2905-2927, 1999.
- DAVALLI, A.M. et al. Dihydropyridine-sensitive and -insensitive voltage-operated calcium channels participate in the control of glucose-induced insulin release from human pancreatic β cells. **The Journal of Endocrinology**, v.150 p.195-203, 1996.
- DE FRONZO RA. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v.131 p.281-303. 1999.
- DE MELO, E.B.; CARVALHO, I. α e β -Glucosidases como alvos moleculares para desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v.29 p.840-843, 2006.
- DEL PRATO, S.; MARCHETTI, P.; BONADONNA, R.C. Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. **Diabetes**, v.51 p.S109-S116, 2002.
- DENG, Y.X. et al. Polysaccharide from *Gynura divaricata* modulates the activities of intestinal disaccharidases in streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v.31 p.1-7, 2011.
- DEROSA, G.; MAFFIOLI, P. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. **Archives of Medical Sciences**, v.8 p.899-906, 2012.
- DESHMUKH, A. et al. Exercise-induced phosphorylation of the novel Akt substrates AS160 and filamin A in human skeletal muscle. **Diabetes**, v.55 p.1776-1782, 2006.
- DÍAZ DE LEÓN-CASTAÑEDA, C. et al. Cost-effectiveness study of oral hypoglycemic agents in the treatment of outpatients with type 2 diabetes attending a public primary care clinic in Mex-

- ico City. **ClinicoEconomics and Outcomes Research: CEOR**, v.4 p.57-65, 2012.
- DONATH, M.Y.; HALBAN, P.A. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. **Diabetologia**, v.47 p.581-589, 2004.
- DOS SANTOS, J.M. et al. The effect of age on glucose uptake and GLUT1 and GLUT4 expression in rat skeletal muscle. **Cell Biochemistry and Function**, v.30 p.191-197, 2012.
- DOUEN, A.G. et al. Exercise induces recruitment of the “insulin-responsive glucose transporter”: evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v.265 p.13427-13430, 1990.
- DOYLE, M.E.; EGAN, J.M. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. **Pharmacological Reviews**, v.55 p.105-131, 2003.
- DYER, J. et al. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. **American Journal Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.282 p.G241-248, 2002.
- EGAN, J.J. et al. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89 p.8537-8541, 1992.
- EICHHORN, J. et al. Insulin activates phospholipase C-gamma1 via a PI-3 cinase dependent mechanism in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.282 p.615-620, 2001.
- EL-ASSAAD, W. et al. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. **Endocrinology**, v.144 p.4154-4163, 2003.
- ELIASSON, L. et al. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. **The Journal of Physiology**, v.586 p.3313-3324, 2008.
- EYSTER, C.A.; OLSON, A.L. Compartmentalization and regulation of insulin signaling to GLUT4 by the cytoskeleton. **Vitamins and Hormones**, v.80 p.193-215, 2009.

- FARESE, R.V.; SAJAN, M.P. Metabolic functions of atypical protein kinase C: "good and bad." **The American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v.298 p.385-394, 2010.
- FEDERIUK, I.F. et al. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. **Comparative medicine**, v.54 p.252-257, 2004.
- FELDMAN, J.M.; LEOVITZ, H.E.; DURHAM, N.C. An insulin dependent effect of chronic tolbutamide administration on the skeletal muscle carbohydrate transport system. **Diabetes**, v.18 p.84-95, 1969.
- FLETCHER, L.M. et al. Role for the microtubule cytoskeleton in GLUT4 vesicle trafficking and in the regulation of insulin-stimulated glucose uptake. **Biochemical Journal**, v.2 p.267-276, 2000.
- FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v.13 p.167-198, 2006.
- FRAGA, A.G. et al. Synthesis and pharmacological evaluation of novel heterocyclic acylhydrazone derivatives, designed as PAF antagonists. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.11 p.285-290, 2000.
- FREDERICO, M.J. et al. Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.12 p.2049-2058, 2012.
- FREDERICO, M.J. et al. Antidiabetic effects of sulfonamide derivatives based on structural fragment of sulphonylureas. **Current Trends in Medicinal Chemistry**, In press.
- FUKUEN, S.; et al. Sulfonylurea agents exhibit peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonistic activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280 p.23653-23659, 2005.

- GARRINO, M.G. et al. Mechanism of the stimulation of insulin release in vitro by HB 699, a benzoic acid derivative similar to the non-sulphonylurea moiety of glibenclamide. **Diabetologia**, v.28 p.697-703, 1985.
- GENG, X. et al. The insulin secretory granule is the major site of K⁺-ATP channels of the endocrine pancreas. **Diabetes**, v.52 p.767-776, 2003.
- GERICH, J.E. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. **Endocrine Reviews**, v.19 p.491-503, 1998.
- GILON, P. et al. Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. **Diabetes**, v.51 p.144-151, 2002.
- GILON, P.; HENQUIN, J.C. Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca²⁺ concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic β -cell. **The Journal of Biological Chemistry**, v.15 p.20713-20720, 1992.
- GRIBBLE, F.M. et al. Tissue specificity of sulphonylureas: studies on cloned cardiac and beta-cell K⁺-ATP channels. **Diabetes**, v.47 p.1412-1418, 1998.
- GRIBBLE, F.M.; ASHCROFT, F.M. Differential sensitivity of β -cell and extrapancreatic K⁺-ATP channels to gliclazide. **Diabetologia**, v.42 p.845-848, 1999.
- GRIBBLE, F.M.; REIMANN, F. Differential selectivity of insulin secretagogues: mechanisms, clinical implications, and drug interactions. **Journal of diabetes and its complications**, v.17 p.11-15, 2003.
- GRIBBLE, F.M.; TUCKER, S.J.; ASHCROFT, F.M. The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of K⁺-ATP currents: a reinterpretation. **The Journal of Physiology**, v.504 p.35-45, 1997.
- GRILLO, M.L. et al. Testosterone rapidly stimulates insulin release from isolated pancreatic islets through a non-genomic dependent mechanism. **Hormone and Metabolic Research**, v.37 p.662-665, 2005.
- GUIOT, Y. et al. No decrease of the beta-cell mass in type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v.50 p.S188, 2001.
- HAMDEN, K. et al. Inhibitory effects of estrogens on digestive enzymes, insulin deficiency, and pancreas toxicity in diabetic

- rats, **Journal of physiology and biochemistry**, v.67 p.121-128, 2011.
- HANLEY, S. Pancreatic β -Cell Mass as a Pharmacologic Target in Diabetes. **Mcgill Journal of Medicine. In: International Forum for the Advancement of Medical Sciences by Students**, v.12 p.51, 2009.
- HAYASHI, T. et al. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. **Diabetes**, v.47 p.1369-1373, 1998.
- HENQUIN, J.C. et al. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. **European journal of clinical investigation**, v.33 p.742-50. 2003.
- HENQUIN, J.C. Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. **Diabetes**, v.53 p.48-58. 2004.
- HENQUIN, J.C. The fiftieth anniversary of hypoglycaemic sulphonamides. How did the mother compound work? **Diabetologia**, v.35 p.907-912. 1992.
- HIRAMATSU, S. et al. Treatment with diazoxide causes prolonged improvement of β -cell function in rat islets transplanted to a diabetic environment. **Metabolism**, v.49 p.657-661, 2000.
- HJELM, K. et al. Religious and cultural distance in beliefs about health and illness in women with diabetes mellitus of different origin living in Sweden. **International journal of nursing studies**, v.40 p.627-643, 2003.
- HOLMAN RR. Assessing the potential for alpha-glucosidase inhibitors in prediabetic states. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.40 p.S21-25. 1998
- HUANG, M., JOSEPH, J.W. Assessment of the metabolic pathways associated with glucose-stimulated biphasic insulin secretion. **Endocrinology**, v.155 p.1653-1666, 2014.
- HUANG, J. et al. Disruption of microtubules ablates the specificity of insulin signaling to GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280 p.42300-42306, 2005.
- HUEBSCHMANN, A.G.; et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v.29 p.1420-1432, 2006.

- HUTCHESSON, A. et al. Measurement of lactate in cerebrospinal fluid in investigation of inherited metabolic disease. **Clinical chemistry**, v.43 p.158-161, 1997.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 5th ed. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2011.
- JALALI-HERAVI, M.; KYANI, A. Application of genetic algorithm-kernel partial least square as a novel nonlinear feature selection method: activity of carbonic anhydrase II inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.42 p.649-659, 2007.
- JENSEN, J. et al. Evidence that nitroprusside stimulates glucose uptake in isolated rat cardiomyocytes via mitogen-activated protein kinase. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v.111 p.239-245, 2003.
- JING, X. et al. $\text{Ca}_{v2.3}$ calcium channels control second-phase insulin release. **The Journal of clinical investigation**, v.115 p.146-154, 2005.
- KAHN, S.E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v.46 p.3-19, 2003.
- KANE, S. et al. A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277 p.22115-22118, 2002.
- KANO, Y. et al. Rosiglitazone, insulin treatment, and fasting correct defective activation of protein kinase C- ζ /lambda by insulin in vastus lateralis muscles and adipocytes of diabetic rats. **Endocrinology**, v.142 p.1595-1605, 2001.
- KAPPEL, V.D. et al. Involvement of GLUT4 in the Stimulatory Effect of Rutin on Glucose Uptake in Soleus Muscle. **The Journal and Pharmacy and Pharmacology**, v.65 p.1179-1186, 2013.
- KAPPEL, V.D. et al. Rutin potentiates calcium uptake via voltage-dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.532 p.55-60, 2013.
- KAWABATA, K. et al. Prenylated chalcones 4-hydroxyderricin and xanthoangelol stimulate glucose uptake in skeletal muscle

- cells by inducing GLUT4 translocation. **Molecular Nutrition and Food Research**, v.55 p.467-475, 2011.
- KAYALI, A.G. et al. Association of the insulin receptor with phospholipase C-gamma (PLCgamma) in 3T3-L1 adipocytes suggests a role for PLCgamma in metabolic signaling by insulin. **The Journal of Biology Chemistry**, v.273 p.13808-13818, 1998.
- KIHO, T. et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.68 p.200-205, 2004.
- KITAHARA, Y. et al. Nateglinide stimulates glucagon-like peptide-1 release by human intestinal L cells via a K(ATP) channel-independent mechanism. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.34 p.671-676, 2011.
- KLEINSORGE, H. Carbutamide--the first oral antidiabetic. A retrospect. **Experimental and clinical endocrinology e diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v.106 p.149-151, 1998.
- KLOPPPEL, G. et al. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. **Survey and Synthesis of Pathology Research**, v.4 p.110-125, 1985.
- KONRAD, D. et al. The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. **Diabetes**, v.50 p.1464-1471, 2001.
- KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical biochemistry**, v.4 p.14-22, 1962.
- KUMAR, N.; DEY, C.S. Gliclazide increases insulin receptor tyrosine phosphorylation but not p38 phosphorylation in insulin-resistant skeletal muscle cells. **The Journal of Experimental Biology**, v.205 p.3739-3746, 2002.
- LACY, P.E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v.16, p.35-39, 1967.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227 p.680-685, 1970.
- LAZZAROTTO M; HEINZEN VE F; YUNES R. Optimized modified topliss method: a tool for quantitative structure-activity rela-

- tionship studies. *Arzneimittel-Forschung /Drug Research*, v. 55 p.604-635, 2005.
- LEBRUN, P. et al. Activation of ATP-dependent K⁺ channels and inhibition of insulin release: effect of BPDZ 62. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.277 p.156-162, 1996.
- LEÓN-REYES, M.R.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; ORTIZ, M.I. Pharmacokinetic of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the rat. **Journal of pharmacy e pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v.12 p.280-287, 2009.
- LESLIE, R.D.; COHEN, R.M. Biologic variability in plasma glucose, hemoglobin A1c, and advanced glycation end products associated with diabetes complication. *Journal of Diabetes Scince and Technology*, v3 p.635-643, 2009.
- LI, W. et al. Antiglycation effect of gliclazide on in vitro AGE formation from glucose and methylglyoxal. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, v.233 p.176-179, 2008.
- LIU, J. et al. APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular and Cellular Biology**, v.22 p.3599-3609, 2002.
- LIU, L. et al. Berberine suppresses intestinal disaccharidases with beneficial metabolic effects in diabetic states, evidences from in vivo and in vitro study. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.381 p.371-381, 2010.
- LIU, L. et al. Insulin deficiency induces abnormal increase in intestinal disaccharidase activities and expression under diabetic states, evidences from in vivo and in vitro study. **Biochemical Pharmacology**, v.82 p.1963-1970, 2011.
- LIU, X.J. et al. Atypical protein cinase C in glucose metabolism. **Cellular Signalling**, v.18 p.2071-2076, 2006.
- LIZUNOV, V.A. et al. Insulin stimulates the halting, tethering, and fusion of mobile GLUT4 vesicles in rat adipose cells. **The Journal of Cell Biology**, v.169 p.481-489, 2005.

- LOUBATIÈRES-MARIANI, M.M. The discovery of hypoglycemic sulfonamides. **Journal de la Société de Biologie**, v.201 p.121-125, 2007.
- LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v.193 p.265-275, 1951.
- LUZI, L.; POZZA, G. Glibenclamide: an old drug with a novel mechanism of action? **Acta diabetologica**, v.34 p.239-44, 1997.
- MAEDLER, K. et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. **Diabetes**, v.50 p.1683-1690, 2001.
- MATSCHINSKY, F.M. Regulation of pancreatic beta-cell glucocinase: from basics to therapeutics. **Diabetes**, v.51 p.394-404, 2002.
- MEDINA-GOMEZ G, et al. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform. **Diabetes**, v.54 p.1706-1716, 2005.
- MENDEZ, C.F. et al. Rapid association of protein kinase C- ϵ with insulin granules is essential for insulin exocytosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278 p.44753-44757, 2003.
- MENEGAZ, D. et al. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.246 p.128-134, 2006.
- MEYER, M. et al. Structural requirements of sulphonylureas and analogues for interaction with sulphonylurea receptor subtypes. **British journal of pharmacology**, v.128 p.27-34, 1999.
- MICHAEL, J. et al. Studies on the molecular organization of rat insulin secretory granules. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262 p.16531-16535, 1987.
- MIINEA, C.P. et al. AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain. **Biochemical Journal**, v.391 p.87-93, 2005.
- MIKI, T. et al. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in K^+ -ATP channel-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95 p.10402-10406, 1998.
- MIKI, T. et al. ATP-sensitive potassium channels participate in glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue.

- American Journal Physiology: Endocrinology and Metabolism**, v.283 p.E1178-E1184, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. FARMÁCIA POPULAR: portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1095. [Acesso em agosto de 2013].
- MISLER, S. et al. Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human beta-cells. **Diabetes**, v.41 p.1221-1228, 1992.
- MORGAN, B.J.; CHAI, S.Y.; ALBISTON, A.L. GLUT4 associated proteins as therapeutic targets for diabetes. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v.5 p.25-32, 2011.
- MOYERS, J.S. et al. Overexpression of Rad inhibits glucose uptake in cultured muscle and fat cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271 p.23111- 23116, 1996.
- MU, J. et al. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. **Molecular Cell**, v.7 p.1085-1094, 2001.
- MULLER, G.; et al. Insulin-mimetic signaling by the sulfonylurea glimepiride and phosphoinositolglycans involves distinct mechanisms for redistribution of lipid raft components. **Biochemistry**, v.40 p.14603-14620, 2001.
- MÜLLER, G; GEISEN, K. Characterization of the molecular mode of action of the sulfonylurea, glimepiride, at adipocytes. **Hormone and Metabolic Research**; v.284 p.69-487, 1996.
- MULLER, M.; WIED, S. The sulfonylurea drug, glimepiride, stimulates glucose transport, glucose transporter translocation, and dephosphorylation in insulin-resistant rat adipocytes *in vitro*. **Diabetes**, v.42 p.1852-1867, 1993.
- MYERS, M.G. et al. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.21 p.10350-10354, 1992.
- NELSON, D.; COX, M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2011
- NEWTON, C.A.; RASKIN, P. Diabetic ketoacidosis in type 1 and type 2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. **Archives of Internal Medicine**, v.164 p.1925-1931, 2004.

- NOZAKI, S. et al. Akt2 regulates Rac1 activity in the insulin-dependent signaling pathway leading to GLUT4 translocation to the plasma membrane in skeletal muscle cells. **Cell Signal**, v.25 p.1361-1371, 2013.
- OGG, S. et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. **Nature**, v.6654 p.994-6659, 1997.
- OLOFSSON, C.S. et al. Palmitate increases L-type Ca^{2+} currents and the size of the readily releasable granule pool in mouse pancreatic beta-cells. **The Journal of physiology**, v.15 p.935-948, 2004.
- OLSON, A.L. et al. Insulin promotes formation of polymerized microtubules by a phosphatidylinositol 3-kinase-independent, actin-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Endocrinology**, v.144 p.5030-5039, 2003.
- PARSONS, T.D. et al. Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. **Neuron**, v.15 p.1085-1096, 1995.
- PATEL, H. et al. Trends in the prescription and cost of diabetic medications and monitoring equipment in England 1991-2004. **Journal of Public Health**, v.29 p.48-52, 2007.
- PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clinical Diabetes**, v.21 p.186-187, 2003.
- PEREIRA, D. et al. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. **Nutrition**, v.27 p.1161-1167, 2011.
- PFEIFER, M.A. et al. Potentiation of insulin secretion to non-glucose stimuli in normal man by tolbutamide. **Diabetes**, v.29 p.335-340, 1980.
- PICK, A. et al. Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. **Diabetes**, v.47 p.358-64, 1998.
- PROKS, P. et al. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. **Diabetes**, v.51 p.S368-S376, 2002.
- PULIDO, N. et al. Gliclazide treatment of streptozotocin diabetic rats restores GLUT4 protein content and basal glucose uptake in skeletal muscle. **Metabolism**, v.46 p.10-13, 1997.
- PULIDO, N. et al. Sulfonylureas stimulate glucose uptake through

- GLUT4 transporter translocation in rat skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.228 p.499-504, 1996.
- PULIDO, N. et al. Sulphonylurea stimulates glucose uptake in rats through an ATP-sensitive K^+ channel dependent mechanism. **Diabetologia**, v.39 p.22-27, 1996
- QUASEEM, A. et al. Clinical Efficacy. Assessment Subcommittee of the American College of Physicians. **Annals of Internal Medicine**, v.18 p.417-422, 2007.
- RABUAZZO, A.M. et al. Glyburide and tolbutamide induce desensitization of insulin release in rat pancreatic islets by different mechanisms. **Endocrinology**, v.131 p.1815-1820, 1992.
- RAJAN, A.S. et al. Ion channels and insulin secretion. **Diabetes Care**, v.13 p.340-363, 1990.
- RENSTROM, E. et al. Sulfonylurea-mediated stimulation of insulin exocytosis via an ATP-sensitive K^+ channel-independent action. **Diabetes**, v.51 p.33-36, 2002.
- RHODES, C.J. Type 2 diabetes - a matter of beta-cell life and death? **Science**, v.21 p.380-384, 2005.
- RITZEL, R.A. et al. Relationship between beta-cell mass and fasting blood glucose concentration in humans. **Diabetes Care**, v.29 p.717-718, 2006.
- RODRIGUEZ, E. et al. Phosphatidylinositol 3-cinase activation is required for sulfonylurea stimulation of glucose transport in rat skeletal muscle. **Endocrinology**, v.145 p.679-685, 2004.
- ROGERS, B.J.; STANDAERT, M.L.; POLLET, R.J. Direct effects of sulfonylurea agents on glucose transport in the BC3-H1 myocyte. **Diabetes**, v.36 p.1292-1296, 1987.
- RORSMAN, P. et al. The cell physiology of biphasic insulin secretion. **News Physiological Sciences**, v.15 p.72-77, 2000.
- ROTHMAN, D.L. et al. Quantitation of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in fasting humans with ^{13}C NMR. **Science**, v.254 p.573-576, 1991.
- RUSS, U. et al. Coexpression with the inward rectifier K^+ channel Kir6.1 increases the affinity of the vascular sulfonylurea receptor SUR2B for glibenclamide. **Molecular Pharmacology**, v.56 p.955-961, 1999.

- RUSSEL, R.R. et al. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v.503 p.495-503, 2004.
- SAAD, M.J. et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **The Journal of Clinical Investigation**, v.4 p.2065-2072, 1993.
- SAKAMOTO, K. et al. Disappearance of glibenclamide-induced hypoglycemia in Wistar-Kyoto rats. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.29 p.574-576, 2006.
- SAKURA, H. et al. Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle. **FEBS Letters**, v.377 p.338-344, 1995.
- SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414 p.799-806, 2001.
- SCARSI, M. et al. Sulfonylureas and glinides exhibit peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity: a combined virtual screening and biological assay approach. **Molecular Pharmacology**, v.71 p.398-406, 2007.
- SCHNEIDER, S.S. et al. Synthesis and evaluation of a glibenclamide glucose-conjugate: a potential new lead compound for substituted glibenclamide derivatives as islet imaging agents. **Regulatory Peptides**, v.139 p.122-127, 2007.
- SCHULLA, V. et al. Impaired insulin secretion and glucose tolerance in β -cell-selective $\text{Ca}_v1.2 \text{ Ca}^{2+}$ channel null mice. **EMBO Molecular Medicine**, v.22 p.3844-3854, 2003.
- SEHATA, I.A. et al. Synthesis and biological testing of certain 1,3,4-oxadiazole and 1,2,4-triazole derivatives as potential antimicrobial agents. **Scientia Pharmaceutica**, v.64 p.133, 1996.
- SEINO, S. et al. Diverse roles of K_{ATP} channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. **Diabetes**, v.49 p.311-318, 2000.
- SEMIZ, S. et al. Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. **EMBO Journal**, v.22 p.2387-2399, 2003.
- SILVA, A.G. et al. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogs.

- gues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.16 p.3431-3437, 2005.
- SILVA, F.R. et al. Kaempferol and kaempferitrin: nutraceutical compounds contribute to glucose homeostasis by acting at multiple biological sites. In: Garion Villers; Yves Fougere (Org.). **Kaemperol: Chemistry, Natural Occurrences and Health Benefits**, 1ed. New York: Nova Science Publishers, Inc.v1 p.1-45, 2013.
- SLADEK, R. et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, v.22 p.881-885, 2007.
- SOMWAR, R. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase α and β by insulin and contraction in rat skeletal muscle: potential role in the stimulation of glucose transport. **Diabetes**, v.49 p.1794-1800, 2000.
- STANDAERT, M.L. et al. Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272 p.30075-30082. 1997.
- STEINER, D.F. et al. Chemistry and biosynthesis of the islet hormones: insulin, islet amyloid polypeptide (amylin), glucagons, somatostatin, and pancreatic polypeptide. **Endocrinology**, v.1p.667-696, 2001.
- STRAUB, S.G. et al. Hyperinsulinism of infancy: the regulated release of insulin by K^+ -ATP channel-independent pathways. **Diabetes**, v.50 p.329-339, 2001.
- SWEENEY, G. et al. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274 p.10071-10078, 1999.
- TAN, M.H.; MACLEAN, D.R. Epidemiology of diabetes mellitus in Canada. **Clinical and Investigate Medicine**, v.18 p.240-246, 1995.
- TANDON, R.K.; SRIVASTAVA, L.M.; PANDEY, S.C. Increased disaccharidase activity in human diabetics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.6 p.621-625, 1975.

- TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v.7 p.85-96, 2006.
- TIAN, B. et al. Synthesis and antiviral evaluation of new N-acylhydrazones containing glycine residue. **Chemical Biology and Drug Design**, v.77 p.189-198, 2011.
- TIMMERS, S.; SCHRAUWEN, P.; DE VOGEL, J. Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. **Physiology and Behavior**, v.94 p.242-251, 2008.
- TING, H.J.; KHASAWNEH, F.T. Glybenclamide: an antidiabetic with in vivo antithrombotic activity. **European Journal of Pharmacology**, v.649 p.249-254, 2010.
- TOPLISS, J.G. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.15 p.1006-1011, 1972.
- TROEBERG, L. et al. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured Trypanosoma brucei brucei. **Molecular Medicine**, v.6 p.660-669, 2000.
- TSIANI, E. et al. Stimulation of glucose uptake and increase of plasma membrane content of glucose transporters in L6 skeletal muscle cells by the sulfonylureas gliclazide and glyburide. **Endocrinology**, v.136 p.2505-2512, 1995.
- TUCKER, S.J. et al. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. **Nature**, v.387 p.179-183, 1997.
- TUSNADY, G.E. et al. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. **FEBS Letters**, v.402 p.1-3, 1997.
- UFSC. Universidade Federal de Santa Catarina. Acil-hidrazonas como protótipo de novos fármacos para leucemia linfóide aguda (LLA). B. R. **Patent** 0000221109711624, nov, 2011.
- UNDERWOOD, D.C. et al. SB 239063, a potent p38 MAP Kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.293 p.281-288, 2000.

- VARLEY, H.; GOWENLOCK, A.H.; BELL, M. In: **Practical Biochemistry**. Eds. Heinemann IW. 5rd ed. London.v.1 p.389-391, 1976.
- WANG, P.H. et al. Coordinate regulation of glucose transporter function, number and gene expression by insulin and sulfonylureas in L6 rat skeletal muscle cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.84 p.62-67, 1989.
- WANG, S. et al. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.95 p.117-126, 2008.
- WANG, Z. et al. Identifying Novel Molecular Structures for Advanced Melanoma by Ligand-Based Virtual Screening. **The Journal of Chemical Information and Modeling**, v.49 p.1420-1427, 2009.
- WATSON, R.T.; PESSIN, J.E. GLUT4 translocation: The last 200 nanometers. **Cellular Signaling**, v.19 p.2209-2217, 2007.
- WATSON, R.T.; KANZAKI, M.; PESSIN, J.E. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. **Endocrine Reviews**. V.25 p.177-204, 2004.
- WEIR, G.C. et al. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. **Diabetes**, v.50 p.S154-S159, 2001.
- WHITE, M.F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.182 p.3-11, 1998.
- WHITING, R. et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research Clinical and Practice**, v.94 p.311-321, 2011.
- XU, T. et al. Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. **Cell**, v.99 p.713-722, 1999.
- YANG, S.N.; BERGGREN, P.O. Cav_{v2.3} channel and PKC: new players in insulin secretion. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115 p.16-20, 2005.
- YANG, S.N.; BERGGREN, P.O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v.27 p.621-676, 2006.

- YANG, S.N.; BERGGREN, P.O. β -Cell Ca_v channel regulation in physiology and pathophysiology. **The American Journal of Physiology**, v.288 p.E16-E28, 2005.
- YEE, H.S; FONG, N.T. A review of the safety and efficacy of acarbose in diabetes mellitus. **Pharmacotherapy**, v.16 p.792-805, 1996.
- YKI-JARVINEN, H. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. **Diabetologia**, v.38 p.1378-1388, 1995.
- YURIEV, E.; KONG, D.C.; ISKANDER, M.N. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.39 p.835-847, 2004.
- ZANATTA, L. et al. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D(3) signaling pathways on calcium uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. **Biochemistry**, v.50 p.10284-10292, 2011.
- ZANATTA, L. et al. Effect of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 in plasma membrane targets in immature rat testis: ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 515 p.46-53, 2011.
- ZANATTA, L. et al. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. **Journal of Natural Products**, v.71 p.532-535, 2008.
- ZAPATA-SUDO, G. et al. Docking, synthesis and anti-diabetic activity of novel sulfonylhydrazone derivatives designed as PPAR-gamma agonists. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.12 p.2037-2048, 2012.
- ZHANG, H.B. et al. Synthesis and biological evaluation of sulfonylurea and thiourea derivatives substituted with benzenesulfonamide groups as potential hypoglycemic agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.19 p.1740-1744, 2009.
- ZIMMET, P.Z. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. **Diabetologia**, v.42 p. 499-518, 1999.